

# **Analyse der Proteinkomposition der Verdauungsflüssigkeit aus Kannen von *Nepenthes* sp.**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemikerin Sandy Rottloff

geboren am 28.06.1978 in Annaberg-Buchholz

Die Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena, Abteilung Bioorganische Chemie, in der Arbeitsgruppe „*Plant Defense Physiology*“, unter der Leitung von PD Dr. Axel Mithöfer angefertigt.

Durchgeführt von 03/2006 bis 09/2011

Gutachter:    1. PD Dr. Axel Mithöfer, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena  
                  2. Prof. Dr. Ralf Oelmüller, Friedrich-Schiller-Universität, Jena  
                  3. Prof. Dr. Irene K. Lichtscheidl, Universität Wien, Wien

Tag der öffentlichen Disputation:                    26. April 2012



***Nepenthes singalana* Becc.**

Die Pflanze trägt drei Kannen unterschiedlicher Entwicklungsstadien.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>III</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>V</b>
<b>Summary</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Pflanzen-Interaktionen mit anderen Organismen	1
1.2 Karnivore Pflanzen	2
1.2.1 Nepenthaceae	4
<i>Struktur und Funktion der Nepenthes-Gleitfalle</i>	4
1.3 PR- ( <i>pathogenesis-related</i> ) Proteine	10
1.3.1 <i>Thaumatococcus</i> -like proteins (TLPs)	13
1.3.2 Pflanzenchitinasen	14
1.4 Zielsetzung	14
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Materialien	16
2.1.1 Puffer und Chemikalien	16
2.1.2 Vektoren	16
2.1.3 Organismen	17
2.1.4 Oligonukleotide	18
2.2 Molekularbiologie	20
2.2.1 Extraktion der Nukleinsäuren	20
<i>Isolierung genomischer DNA (gDNA)</i>	20
<i>Isolierung von Gesamt- und messenger RNA</i>	21
<i>Reverse Transkription</i>	22
<i>Plasmid-Präparation</i>	23
2.2.2 PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> )	23
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.4 Klonierung	24
2.2.5 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	24
2.2.6 Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	25
2.2.7 Transkript-Analysen	25
<i>Real-time PCR</i>	25
<i>AFLP (amplified fragment length polymorphism)</i>	27
2.3 Proteinbiochemie	28
2.3.1 Allgemeine Techniken	28
<i>Quantifizierung der Proteine</i>	28
<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</i>	28
<i>Proteinfärbemethoden</i>	29
2.3.2 Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	30
<i>Proteinexpression</i>	30
<i>Proteinaufreinigung</i>	30
2.3.3 Charakterisierung der Proteine	30
<i>Agardiffusionstest</i>	30
<i>Wachstumskurven</i>	31
<i>Trypsin-Inhibitor-Test</i>	31

Überprüfung hydrolytischer Eigenschaften	32
2.4 Bioinformatik	33
2.5 Mikropräparation	34
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1 Heterologe Expression der Proteine in <i>E. coli</i>	36
3.1.1 Expression des <i>Thaumatococcus</i> -like proteins aus <i>N. gracilis</i> (NgTLP)	36
3.1.2 Expression der Chitinase aus <i>N. rafflesiana</i> (NrChit1)	36
3.2 Proteincharakterisierung	37
3.2.1 <i>Thaumatococcus</i> -like protein (NgTLP)	37
Proteinstruktur	37
Untersuchung antimikrobieller Eigenschaften	39
Überprüfung der hydrolytischen Aktivität	45
Analyse der Trypsin-inhibierenden-Funktion	45
3.2.2 Chitinase aus <i>Nepenthes rafflesiana</i> (NrChit1)	47
Proteinstruktur	47
Untersuchung der chitinolytischen Aktivität	50
3.3 Mikropräparation	53
3.3.1 Die Verdauungszone verschiedener <i>Nepenthes</i> -Kannen	54
3.3.2 Isolierung verschiedener Gewebearten aus <i>Nepenthes</i> -Kannen	55
Präparationsaufbau	55
Drüsenpräparation	56
3.3.3 Applikationen des Mikropräparationsverfahrens	57
PCR von Drüsen aus der Verdauungszone von <i>Nepenthes</i> -Kannen	57
Optimierung der RNA-Extraktion aus kleinen Gewebemengen	58
3.4 Die NgTLP- und NrChit1-Sequenzen verschiedener <i>Nepenthes</i> -Arten	59
3.5 Transkript-Analysen	65
3.5.1 Real-time PCR	65
Identifizierung möglicher Referenzgene	65
Untersuchung der NgTLP- und NrChit1-Expression im Kannengewebe	67
3.5.2 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)	70
<b>4 Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1 Präparation verschiedener Gewebearten aus <i>Nepenthes</i> -Kannen	74
4.2 Die Expression von NgTLP und NrChit1 im Kannengewebe	76
4.3 Weitere Transkriptanalysen in <i>Nepenthes</i> -Kannen	77
4.4 Expression des <i>Thaumatococcus</i> -like proteins und der Chitinase	79
4.5 Charakterisierung zweier PR-Proteine aus dem <i>Nepenthes</i> -Verdauungssekret	81
4.5.1 Das <i>Thaumatococcus</i> -like protein aus <i>N. gracilis</i> (NgTLP)	81
4.5.2 Chitinase aus <i>N. rafflesiana</i> (NrChit1)	84
4.6 Ausblick	87
<b>5 Referenzen</b>	<b>88</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>100</b>
Zusätzliche experimentelle Daten	100
Curriculum Vitae	113
Veröffentlichungen	114
Danksagung	115
Erklärung	116

## Abkürzungen

2D	2-Dimensional
4MU	4-Methylumbelliferon
4MU-(GlcNAc) <sub>1</sub>	(4MU) <i>N</i> -Acetyl-β-D-glucosaminid
4MU-(GlcNAc) <sub>2</sub>	4MU- <i>N,N'</i> -Diacetyl-β-D-chitobiosid
4MU-(GlcNAc) <sub>3</sub>	4MU-β-D- <i>N,N',N''</i> -Triacetylchitotriose
AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
cDNA	<i>copy</i> DNA
CM-Chitin-RBV	<i>Carboxymethyl-Chitin-Remazol Brilliant Violet</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>DNase</i>	DNA-Ribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFN	extraflorale Nektardrüsen
ET	Ethylen
EtOH	Ethanol
gDNA	genomische DNA
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
LB	Luria Bertani
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MeOH	Methanol
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Bethesda MD, USA
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

PR	<i>pathogenesis-related</i>
pv.	pathovar
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription
RV	Leserasterverschiebung
SA	Salizylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SC	Stop-Codon
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SP	Signalpeptid
TE	Tris/EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TLP	<i>Thaumatococcus-like protein</i>
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	über Nacht
VOC	<i>volatile organic compound</i>

## Zusammenfassung

---

Karnivore Pflanzen besiedeln meist nährstoffarme Standorte und sind darauf angewiesen ihre Nährstoffe, v.a. Stickstoff, von Arthropoden zu beziehen. Um Insekten effektiv zu fangen und zu verdauen hat die Gattung *Nepenthes* ein spezialisiertes Fangorgan entwickelt. Diese sogenannten Gleitfallen sind aus der Blattspreite gebildete, becherförmige Kannen und dienen neben dem Anlocken und Fangen auch dem Verdauen der Beute. Letzteres erfolgt über pflanzeigene Enzyme. Die Kanne ist in drei Zonen gegliedert. Deckel und Peristom dienen der Anlockung der Beute. Beide Strukturen besitzen extraflorale Nektardrüsen, deren Duft Insekten ködert. In der Gleitzone verhindern deformierte Stomatazellen sowie Wachskristalle ein Entkommen der Beute. Die unteren zwei Drittel der Kanne bilden die Verdauungszone. Diese enthält das Kannensekret und multizelluläre Drüsen, die in epidermales Gewebe eingebettet sind. Die Verdauungsflüssigkeit enthält die für die Zersetzung der Nährstoffe erforderlichen Enzyme. Interessanterweise können die bisher identifizierten Proteine den Familien der PR- (*pathogenesis related*) Proteine zugeordnet werden. Neben hydrolytischen Enzymen wurden auch Proteine mit antimikrobiellen Eigenschaften in Kannensekret nachgewiesen. In unserer Arbeitsgruppe konnten über einen proteomischen Ansatz kombiniert mit molekularbiologischen Analysen eine Chitinase aus *N. rafflesiana* (NrChit1) und ein Thaumatin-like protein aus *N. gracilis* (NgTLP) isoliert werden. Die kodierenden Gene konnten aus acht verschiedenen *Nepenthes*-Arten kloniert werden. Die abgeleiteten Aminosäure- (AS) Sequenzen beider Proteine zeigen Übereinstimmungen von mindestens 93 %. Aufgrund der putativen Signalpeptide werden beide Proteine höchstwahrscheinlich in die Kannenflüssigkeit sekretiert. Transkriptanalysen über *Real-time* PCR zeigten, dass die Expression von NgTLP und NrChit1 durch Beutefang induzierbar ist. Die Gene werden neben den sekretorischen Zellen der Drüsen v.a. im epidermalen Gewebe der Verdauungszone hoch reguliert. NgTLP und NrChit1 wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und die aufgereinigten Proteine strukturell und biochemisch untersucht. Dabei weist NgTLP die generelle 3D-Struktur der PR-5-Proteine auf. Diese besteht aus drei Domänen und enthält die von Domäne I und II gebildete zentrale Spalte mit den vier hochkonservierten sauren AS, welche für die antimykotische Wirkung von TLPs verantwortlich sein sollen. NrChit1 ist eine saure Endochitinase der Klasse III und zeigt die typische TIM-Barrel-Struktur von Glykosidhydrolasen der Familie 18. Die Enzymaktivität beschränkt sich auf polymere *N*-Acetylglucosamin-Ketten und ist auch im Kannensekret verschiedener *Nepenthes*-Arten nachweisbar.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit eine neue Präparationstechnik basierend auf einer Mikrodissektionsplattform etabliert werden, welche es ermöglicht sowohl die sekretorischen Zellen der Drüsen als auch das epidermale Gewebe der Kanne zu isolieren. Die Methode ist eine Alternative zu *Laser Capture Microdissection* (LCM), da hier frisches Pflanzengewebe verwendet werden kann, ohne dass dieses vorher fixiert wird. Außerdem können bestimmte Gene direkt aus den Drüsen über PCR detektiert werden. Weiterhin war es möglich nach der Präparation intakte RNA aus dem sekretorischen und epidermalen Gewebe für Expressionsstudien zu extrahieren, wie erfolgreich an den *Real-time* PCR und AFLP- (*amplified fragment length polymorphism*) Experimenten gezeigt werden konnte.



## Summary

---

Carnivorous plants mostly grow in nutrient-poor habitats and greatly rely on arthropod-derived nutrients, in particular nitrogen. This is especially the case for the pitcher plant *Nepenthes*. Their ecological success strongly depends on the trapping and digestive ability. Therefore, the plants have evolved specialized trapping organs, known as pitchers. Depending on their functions, the pitcher is divided into three zones. The attraction zone consists of the lid and the peristome. On both structures nectarines can be located, whose odor allures insects. Special structures of the slide zone, like deformed stomata cells and a thick wax layer prevent the prey from escaping. After reaching the digestive zone the prey drowns in the pitcher fluid. The inner surface of this area is covered by large multicellular glands, which are embedded in epidermal tissue. The pitcher fluid contains plant-derived enzymes, which are responsible for nutrient degradation. Interestingly, the so far identified proteins belong to the family of PR (pathogenesis related) proteins. In addition to hydrolytic enzymes, proteins with antimicrobial properties can be found in the pitcher fluid. In our group a chitinase from *N. rafflesiana* (NrChit1) and a thaumatin-like protein from *N. gracilis* (NgTLP) were isolated by using a proteomic approach combined with molecular biological analysis. The encoding genes have been cloned from eight different *Nepenthes* species. Among these, the deduced amino acid (aa) sequence similarity was at least 93 %. Both proteins are very probably secreted into the pitcher fluid due to the presence of putative N-terminal signal peptides. Transkript analysis using real-time PCR indicated that the expression of both proteins is inducible by prey capturing. The genes are up-regulated in the secretory cells, but also in the epidermal tissue at an even higher level. NgTLP and NrChit1 were heterologous expressed in *E. coli*, and the purified proteins were structurally and biochemically analyzed. NgTLP shows the general three domain structure of PR-5 proteins with domain I and II forming the central cleft. It also contains the four highly conserved acidic aa's, responsible for the antifungal activity in TLPs. NrChit1 is an acidic Endochitinase class III, and shows the typical TIM barrel structure of glycoside hydrolases from family 18. The enzyme activity is limited to longer chains of *N*-acetyl glucosamine, and can be detected in the pitcher fluid of various *Nepenthes* species.

Further, a new micropreparation technique has been established to isolate the secretory cells from glands as well as the epidermal tissue of the digestive zone, based on a microdissection platform. This method is an alternative to laser capture microdissection (LCM) because fresh plant tissue can be used directly without previous fixation. In addition individual genes can be detected directly from the glands in a PCR reaction. Moreover, for expression studies intact RNA can be isolated from secretory and epidermal tissue, as successfully could be shown on real-time PCR and AFLP (amplified fragment length polymorphism) experiments.

### 1.1 Pflanzen-Interaktionen mit anderen Organismen

Wie alle Organismen werden auch Pflanzen von ihrer Umgebung mit einer Reihe von Herausforderungen konfrontiert. Diese können von biotischer oder abiotischer Natur, z.B. Trockenheit, Kälte, Hitze, Salzbelastung, UV-Licht und oxidativer Stress, sein. Biotische Interaktionen beinhalten die Kommunikation mit anderen Organismen und erfolgen aufgrund der Ortsgebundenheit der Pflanze physikochemisch. Dies kann im kooperativen Sinne erfolgen, z.B. mit bestäubenden Insekten oder in symbiotischen Zusammenschlüssen z.B. Stickstoff-fixierenden Rhizobien und in Mykorrhizen (Sitte *et al.*, 2002). Andere sind Abwehrmechanismen gegen Herbivore oder Krankheitserreger, wie pathogene Viren, Bakterien und Pilze. Dabei wird zwischen passiver und aktiver Abwehr unterschieden. Passive Mechanismen stellen die sogenannten präformierten Barrieren dar (Thatcher *et al.*, 2005), welche sowohl physikalischer als auch biochemischer Natur sein können. Diese sind bereits in der gesunden Pflanze ausgeprägt und unterliegen keiner *de novo*-Synthese nach Pathogenbefall. Beispielsweise halten Dornen oder Stacheln größere Herbivoren ab und massive Zellwände sowie eine wachshaltige Kutikula verhindern eine Penetration durch Bakterien oder Pilze. Trichome bilden eine mechanische Barriere gegen kleine Herbivoren und können zusätzlich sekretorische Strukturen aufweisen, die antimikrobielle Stoffe, z.B. Abwehrstoffe oder Toxine, produzieren und speichern (Sitte *et al.*, 2002; Mithöfer *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu wird die aktive oder auch induzierte Abwehr nur in Situationen der Bedrohung aktiviert. Diese können weiter in direkte oder indirekte Antworten gegliedert werden. Erstere ist direkt auf den angreifenden Organismus gerichtet und beinhaltet die induzierte Speicherung von Toxinen und Abwehrstoffen, die Verstärkung der Zellwände und die hypersensitive Reaktion. Die indirekte Abwehr richtet sich hauptsächlich gegen Herbivoren. Dabei manipuliert die Pflanze das Verhalten von Räubern oder Parasiten der Fraßfeinde und erhöht somit den Schutz der Pflanze. Der Mechanismus beinhaltet beispielsweise das Anbieten einer Behausung für Karnivore oder von alternativen Nährstoffquellen, wie extrafloralem und floralem Nektar oder *food bodies* (Sitte *et al.*, 2002; Mithöfer *et al.*, 2009). Mit der Abgabe von Duftstoffen (VOCs, *volatile organic compounds*) teilt die Pflanze den Räubern den Ort der Nährstoffquelle mit (Dicke & Van Poecke, 2002; Kessler & Baldwin, 2002).

Viren, Bakterien und Pilze können nur durch direkte Penetration, natürliche Öffnungen (z.B. Stomata und Lentizellen) oder Wunden in Pflanzen eindringen (Agrios, 1978). Für eine erfolgreiche Infektion muss das Pathogen jedoch erst die Pflanzenabwehr überwinden. Dabei werden verschiedene Strategien angewandt z.B. die Produktion von Toxinen, die Synthese von Phytohormonen oder analogen Substanzen, die Manipulation der Physiologie des Wirtes und die Synthese von Suppressoren der Pflanzenantwort oder hydrolytischer Enzyme (Sitte *et al.*, 2002). Die Pflanze ihrerseits hat eine Reihe von Abwehrmechanismen zu bieten, wobei es entscheidend ist, ob es sich bei der Pflanze um einen Wirt oder Nicht-Wirt handelt. Die Wirt-spezifische Erkennung erfolgt über die Interaktion des R-Proteins der Pflanze mit dem korrespondierenden Avirulenz-Protein des Pathogens (*gene-for-gene resistance*) (Dangl & Jones, 2001; Rathjen & Moffett, 2003; Thatcher *et al.*, 2005). Bei einem Nicht-Wirt ist die Erkennung des angreifenden

Pathogens nicht spezifisch (Thordal-Christensen, 2003; Anderson *et al.*, 2005; Halim *et al.*, 2006), sondern findet über allgemeine Auslöser der Pflanzenabwehr statt. Dies sind Produkte des Zerfalls von Zellwand oder Membran der Pflanze oder des Pathogens an der Infektionsstelle. Beispiele hierfür sind Galacturonsäure aus der äußeren Zellwand der Pflanze, oder Flagellin-Fragmente, Chitin- und Glucan-Oligomere, Pilz-Sterole und Glycopeptid-Fragmente aus dem Pathogen (Ebel & Mithöfer, 1998; Sitte *et al.*, 2002). Oft zeigen diese Merkmale von PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), welche auch für die Pathogen-Erkennung im tierischen Immunsystem verantwortlich sind (Nürnberg *et al.*, 2004). Trotz der Vielfalt der chemischen Strukturen mikrobieller Auslöser sind die Effekte auf die Zelle ähnlich. Die Pflanze reagiert mit strukturell- und chemisch-induzierter Abwehr. Nach einer Erkennung des Pathogens über PAMPs findet eine Aktivierung verschiedener induzierbarer Mechanismen statt. Dabei wird zwischen schnellen, langsamen und späten Reaktionen unterschieden. Zu den Schnellsten zählt der sogenannte *oxidative burst*, welcher bereits Sekunden bis Minuten nach Signal-Perzeption einsetzt. Hier kommt es zu einer raschen, extrazellulären Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), wie z.B. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), dem Superoxid- ( $O_2^{\cdot-}$ ) und dem Hydroxyl-Radikal ( $\cdot OH$ ) (Wojtaszek, 1997). ROS dienen neben ihrer direkten antimikrobiellen Wirkung auch als Co-Substrate für Peroxidasen, die an der Quervernetzung von Zellwandstrukturproteinen oder phenolischer Zellwandbestandteile beteiligt sind (Hatfield *et al.*, 1999). Bei der hypersensitiven Reaktion findet nach Pathogen-Befall ein schneller und lokal begrenzter Tod der infizierten Zellen statt. Damit wird eine weitere Ausbreitung der Krankheit unterbunden. Der Zelltod ist nicht passiv, sondern wird von der Pflanze selbst gesteuert. Deswegen wird die Reaktion auch als eine Form des programmierten Zelltods beschrieben (Greenberg & Yao, 2004).

Langsame Abwehrreaktionen finden durch Genaktivierung statt und werden erst nach einigen Stunden oder Tagen aktiv. Dazu gehört die Synthese von Phytoalexinen. Das sind niedermolekulare Substanzen, z.B. Phenylpropane, Terpene und Fettsäure-Derivate die *de novo*-synthetisiert werden (Harborne, 1988).

Späte Reaktionen wirken innerhalb von Tagen bis Wochen und werden auch als systemisch erworbene Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance*) bezeichnet. Dabei wird über eine lokale Resistenzantwort ein mobiles Signal generiert und durch die Pflanze transportiert. Dies stimuliert allorts Abwehrreaktionen, wie z.B. die Induktion von PR- (*pathogenesis-related*) Proteinen. Dadurch wird die Pflanze resistenter gegenüber nachfolgenden Infektionen. Als Signalmoleküle werden Salizylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) diskutiert (Van Loon *et al.*, 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Pflanze als primärer Produzent von einer Vielfalt parasitär lebender Organismen befallen wird, sich dabei aber durchaus zu wehren weiß. In seltenen Fällen kommt es allerdings vor, dass sprichwörtlich der Spieß umgedreht wird und Tiere als Nährstoffquelle in karnivoren Pflanzen genutzt werden.

## 1.2 Karnivore Pflanzen

Das wissenschaftliche Interesse an karnivoren Pflanzen wurde 1875 durch Charles Darwin geweckt. Diese ergänzen ihren Nährstoffhaushalt (v.a. Stickstoff und Phosphor), indem sie mit spezialisierten Fallen kleine Tiere v.a. Arthropoden anlocken und verdauen (Adamec, 1997).

Hierbei wird zwischen verschiedenen Formen der Karnivorie unterschieden. Eine Grundkarnivorie liegt bei fast allen Pflanzen vor. Dabei werden Abbauprodukte direkt von den Blättern oder über die Wurzeln aufgenommen und führen zu einer Erhöhung der Fitness. Protokarnivore Pflanzen besitzen Fallen um Beute anzulocken, jedoch werden die zur Verdauung benötigten Enzyme nicht von der Pflanze selbst bereitgestellt. Beispielsweise ist die Kannenpflanze *Darlingtonia* bei der Zersetzung der Beute auf Bakterien angewiesen, kann aber die resultierenden Nährstoffe absorbieren. Bei echten Karnivoren werden Anlockung, Fangen und Verdauung der Beute, sowie die Absorption der freigesetzten Nährstoffe von der Pflanze selbst getätigt (Chase *et al.*, 2009). Dabei ist die morphologische und physiologische Vielfalt der Fangmechanismen bemerkenswert. Schon Darwin lieferte in seinem Buch „*Insectivorous plants*“ (1875) eine detaillierte Beschreibung der Strukturen mit denen acht Pflanzengattungen Insekten fangen können. Er zeigte, dass diese tierisches Protein mit Protease-ähnlichen Enzymen verdauen und die resultierenden Nährstoffe aufnehmen können, was zu einer Zunahme des Wachstums der Pflanze führte. Darwin beschrieb sehr detailliert die Struktur von Klebe-, Klapp- und Saugfallen, erwähnte aber auch die Gleitfallen. Die Phylogenie der karnivoren Pflanzen wurde früher aufgrund struktureller Homologien bestimmt, was dazu führte, dass Pflanzen des gleichen Fallentyps einander zugeordnet wurden. Erstaunlicherweise ergaben neuere Studien, basierend auf kombinierten Sequenzanalysen, dass Karnivorie sich mehrfach in der Klasse der Angiospermen entwickelt hat (Ellison & Gotelli, 2009). Die über 660 verschiedenen karnivoren Arten sind in vier der basalen Ordnungen der Angiospermen (Monokotyledonen, Kerneudikotyledonen, Rosiden und Asteriden) und fünf Ordnungen (Poales, Caryophyllales, Oxalidales, Ericales und Lamiales) vertreten, wobei sich mehr als 95 % der karnivoren Pflanzen in den Ordnungen Caryophyllales und Lamiales befinden (Tabelle 1.1).

Ordnung	Familie	Gattung	Anzahl karnivorer Arten
Poales	Bromeliaceae	<i>Brocchinia</i>	3
		<i>Catopsis</i>	1
Caryophyllales	Nepenthaceae	<b><i>Nepenthes</i></b>	~ 120
	Droseraceae	<i>Aldrovanda</i>	1
		<i>Dionaea</i>	1
		<i>Drosera</i>	~ 160
	Drosophyllaceae	<i>Drosophyllum</i>	1
	Dioncophyllaceae	<i>Triphyophyllum</i>	1
Oxalidales	Cephalotaceae	<b><i>Cephalotus</i></b>	1
Ericales	Sarraceniaceae	<b><i>Sarracenia</i></b>	11
		<b><i>Heliophora</i></b>	6
		<b><i>Darlingtonia</i></b>	1
	Roridulaceae	<i>Roridula</i>	2
Lamiales	Lentibulariaceae	<i>Pinguicula</i>	~ 80
		<i>Genlisea</i>	21
		<i>Utricularia</i>	~ 250
	Martyniaceae	<i>Ibicella</i>	1
	Byblidaceae	<i>Byblis</i>	5

**Tabelle 1.1 Aktuelle Eingliederung der karnivoren Pflanzen in die Angiospermen-Phylogenie.**

Die für die jeweilige Gattung auftretenden Falltypen sind wie folgt gekennzeichnet: **Gleit-**, **Reusen-**, **Saug-**, **Klapp-** und **Klebefallen**. (Einteilung nach Ellison & Gotelli, 2009)

In drei der vier Ordnungen haben sich mindestens zwei verschiedene Fallentypen entwickelt. In der Ordnung Laminales reicht die Evolution der Fallenstruktur von Klebe- (*Pinguicula*) bis zu den komplexeren Saug- (*Utricularia*) und deren Subtyp den Reusenfallen (*Genlisea*) (Lloyd, 1942; Guisande *et al.*, 2007). Die Ordnung Poales beinhaltet nur protokarnivore Pflanzen (*Brocchinia* und *Catopsis*) mit Klebefallen. In Oxalidales ist *Cephalotus follicularis* Labill., eine Kannenpflanze, die einzige fleischfressende Pflanze und in Ericales befinden sich Karnivore mit Gleitfallen (*Sarracenia*, *Heliophora* und *Darlingtonia californica* Torr.) und Klebefallen (*Roridula*). Die Beziehung der karnivoren Pflanzen innerhalb der Caryophyllales wurde über Sequenzanalysen des *trnK*-Introns und dem assoziierten *matK*-Gen, zusätzlichen Chloroplasten-Genen (*atpB* & *rbcl*) und der nukleären 18S rDNA aufgeklärt (Heubl *et al.*, 2006). Dabei stellte sich heraus, dass die zwei Arten mit Klappfallen (*Aldrovanda vesiculosa* L. und *Dionaea muscipula* Sol. Ex J Ellis) Schwestergruppen des Sonnentaus (*Drosera*) sind. Die monogene Familie der Nepenthaceae ist eine Schwestergruppe von Droseraceae (Ellison & Gotelli, 2009).

Karnivore Pflanzen mit Gleitfallen werden auch Kannenpflanzen genannt und haben sich während der Evolution dreimal entwickelt. Die Morphologie und Funktionsweise dieser Falle wurde sehr umfangreich v.a. an Nepenthaceae studiert. Da diese Pflanzenfamilie den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit darstellt, soll der Fallentyp im nächsten Abschnitt genauer beschrieben werden.

### 1.2.1 Nepenthaceae

Bis heute wurden rund 120 *Nepenthes*-Arten beschrieben (McPherson, 2009). Diese kommen in Südostasien vor, wobei viele auf Borneo und Sumatra heimisch sind. Biogeographische Ausreißer gibt es in Indien (*N. khasiana* Hook.f.), Sri Lanka (*N. distillatoria* L.), den Seychellen (*N. pervillei* Blume) und Madagaskar (*N. madagascarensis* Poir. & *N. masoalensis* Schmid-Hollinger) (Meimberg *et al.*, 2001; Meimberg & Heubl, 2006; Moran & Clarke, 2010). Die meisten *Nepenthes*-Arten sind terrestrisch, aber eine kleine Anzahl der Arten wachsen epiphytisch (Juniper *et al.*, 1989; Clarke, 2001). Die Pflanzen wachsen als kletternde Sträucher, welche sich an die angrenzende Vegetation durch geschleihte Ranken, die sich an der Spitze der Blattspreite entwickeln, befestigen (Moran & Clarke, 2010). Am Ende der Ranken wird die Gleitfalle gebildet, die dazu dient wirbellose Beute zu fangen und zu verdauen (Kato *et al.*, 1993; Adam, 1997).

#### Struktur und Funktion der *Nepenthes*-Gleitfalle

Gleitfallen sind aus der Blattspreite gebildete, becherförmige und mit Flüssigkeit gefüllte Kannen. Bei *Nepenthes*-Pflanzen weisen diese oft einen Dimorphismus auf, d.h. es werden zwei individuelle Kannentypen gebildet (Juniper *et al.*, 1989). Junge Pflanzen produzieren Rosetten von terrestrischen, sogenannten Bodenkannen. Diese sind klein, eiförmig, am Boden aufsetzend und besitzen Flügelleisten (Abb. 1.1, D). Später kann die Pflanze einen neuen Kannentyp bilden, die sogenannten Luftkannen, die größer und trichter- bzw. zylinderförmig sind (Moran, 1996; Moran & Clarke, 2010). Von manchen Arten ist bekannt, dass die zwei verschiedenen Kannentypen unterschiedliche Beute fangen (Moran, 1996; Moran, *et al.*, 1999; DiGiusto *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2009). *Nepenthes*-Kannen sind passive, gravitationsabhängige Fallen, die eine funktionelle

Gliederung aufweisen (Abb. 1.1) (MacFarlane, 1893; Lloyd, 1942; Adams *et al.*, 1977; Owen & Lennon, 1999). Dabei unterscheidet man zwischen Strukturen, die der Anlockung, dem Fangen, der Verdauung der Beute und der Aufnahme der freigesetzten Nährstoffe dienen.

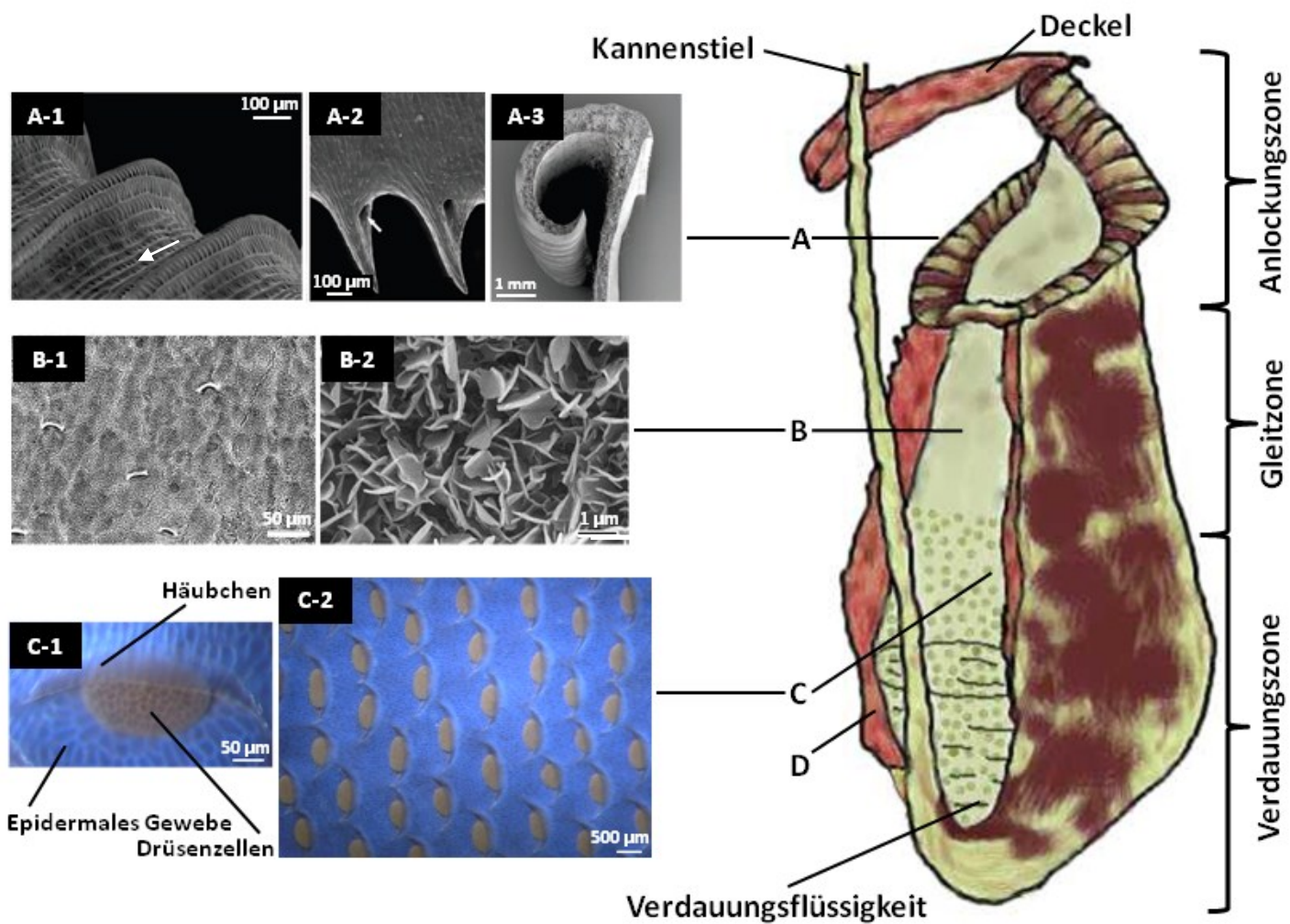
### *Anlockung und Fangen der Beute*

Die Anlockung erfolgt einerseits über extraflorale Nektardrüsen (EFN), die ihre höchste Dichte an Kannendeckel und Peristom (Abb. 1.1, A-2), einer kragenförmigen, die Öffnung umgebenden, überhängenden Struktur, haben. Aber nicht alle *Nepenthes*-Arten sind auf Nektarproduktion angewiesen. Die Kannen von *N. albomarginata* T. Lobb ex Lindl bilden an der Außenseite der Kanne, direkt unter dem Peristom, einen weißen Saum von kurzen Trichomen (Futterhaare), welche ausschließlich Termiten der Unterfamilie Nasutitermitinae (z.B. *Hospitalitermes bicolor*) anlocken, die in Kolonien von Arbeitern auf Futtersuche gehen und in abgeernteten Kannen zu Hunderten bis Tausenden gefunden werden können (Mehrbach *et al.*, 2002).

Andererseits sondern die Luftkannen einiger Arten einen Duft ab, der anthophile Insekten anlockt (Moran, 1996; DiGiusto *et al.*, 2008). Außerdem kann das Farbmuster der Kanne die Beute anlocken, z.B. sticht das Peristom von *N. rafflesiana* in hohen Kontrast zum Rest der Kanne im ultravioletten, blauen und grünen Wellenlängenbereich (350-370, 430-470 und 490-540 nm) hervor. Diese Bereiche entsprechen den visuellen Sensitivitätsmaxima anthophiler Insekten und erregt deren Aufmerksamkeit (Moran, 1993; Moran *et al.*, 1999; Moran & Clarke, 2010).

Das Peristom spielt auch beim Beutefang eine entscheidende Rolle. Dessen Oberfläche weist Reihen überlappender, epidermaler Zellen auf, die strahlenförmig angeordnet sind. Dieses Arrangement zeigt zwei, für den Beutefang bedeutende, Charakteristika. Zum einen Anisotropie, d.h. alle epidermalen Zellen überlappen in der gleichen Richtung, vom äußeren Rand des Peristoms nach innen zur Kannenöffnung (Abb. 1.1, A-1). Dies kann für Insekten, die sich zur Kannenöffnung bewegen, zu Schwierigkeiten führen. Zum anderen ist das Peristom leicht zu befeuchten, d.h. durch Kondensation, hohe Luftfeuchtigkeit oder Regen wird das Peristom sehr rutschig und führt dazu, dass Invertebraten den Halt verlieren und zur Kannenöffnung gleiten, was als *insect aquaplaning* bezeichnet wird (Bohn & Federle, 2004; Bauer *et al.*, 2008; 2009 & 2011). Ist die Beute erst einmal in die Kanne gefallen, verhindern Strukturen der Gleit- und der Verdauungszone ein Entkommen dieser.

Artabhängig besitzt der obere Bereich der Kanneninenseite sichelförmige, modifizierte Stomatazellen (Moran & Clarke, 2010). Diese sind an der Kannenwand überhängend angebracht und verhindern somit Versuche der Beute, sich aufwärts zu bewegen (Abb. 1.1, B-1) (Owen & Lennon, 1999; Gaume *et al.*, 2002, Thornhill *et al.* 2008, Wang *et al.* 2009). Ein weiteres Merkmal dieser Zone, wiederum abhängig von der Art, ist eine Schicht epikutikularer Wachskristalle. Die Zusammensetzung kann innerhalb verschiedener Arten variieren, wird aber von langkettigen Aldehyden (C<sub>30</sub> bis C<sub>32</sub>) und einfachen Alkoholen dominiert (Riedel *et al.*, 2003 & 2007; Scholz *et al.*, 2010). Die Wachsschicht verhindert ein Entkommen der Beute auf zwei Wegen. Erstens setzen die Wachskristalle die Tarsen der Insekten zu und verringern damit deren Effizienz, und zweitens bildet das Wachs eine Struktur geringer Oberflächenenergie. Damit ist die innere Wand unbenetzbar und verhindert, dass Insekten mit haarigen Gliederfüßen Halt über Strömung gewinnen (Owen & Lennon, 1999; Gaume *et al.*, 2002 & 2004; Gorb *et al.*, 2004; Gorb & Gorb, 2006; Wang *et al.* 2009).



**Abbildung 1.1 Kannenanatomie.**

Zeichnung einer *N. henryana*-Kanne.

**A** Peristom, 1: Oberfläche mit überlappenden, epidermalen Zellen (Pfeil zeigt zur Öffnung der Kanne), 2: Unterseite mit zahnartigen Verlängerungen der Rippen und Nektardrüsen, 3: Querschnitt (1-3 Aufnahmen von *N. alata* nach Bohn & Federle, 2004). **B** Innere Oberfläche der Gleitzone, 1: modifizierte Stomata-Zellen, 2: Wachskristalle (1 & 2 Aufnahmen von *N. henryana* nach Riedel *et al.*, 2007). **C** Innenseite der Verdauungszone mit zahlreichen multizellulären Drüsen, 1 & 2 Drüsenzonen einer *N. maxima*-Kanne. **D** Flügelleisten.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Wachsschicht sehr effizient für das Fangen von Ameisen ist. Diese Struktur ist v.a. in *Nepenthes*-Arten, die im Flachland vorkommen, zu finden (Bonhomme *et al.*, 2011(B)).

Schließlich fällt die Beute in die Flüssigkeit, welche sich im unteren Teil der Kanne befindet. Diese ist meist wässrig, kann jedoch in einigen Arten hoch viskoelastisch sein, was sicherstellt, dass die Beute im Sekret bleibt bis sie ertrinkt. Beispiele hierfür sind *N. rafflesiana* (Gaume & Forterre, 2007; DiGiusto *et al.*, 2008), *N. inermis* Danser, *N. aristolochioides* Jebb & Cheek, *N. jacquelineae* Clarke, Davis & Tarmin, *N. dubai* Danser und *N. talangensis* Nerz & Wistuba (Clarke, 2001). Bonhomme *et al.* (2011(B)) konnten zeigen, dass dies meist Arten betrifft, die im Gebirge vorkommen, wo es nur wenige Ameisen gibt. Die Viskoelastizität des Kannensekrets scheint eine besondere Rolle beim Fangen fliegender Insekten zu spielen (Bauer *et al.*, 2011).

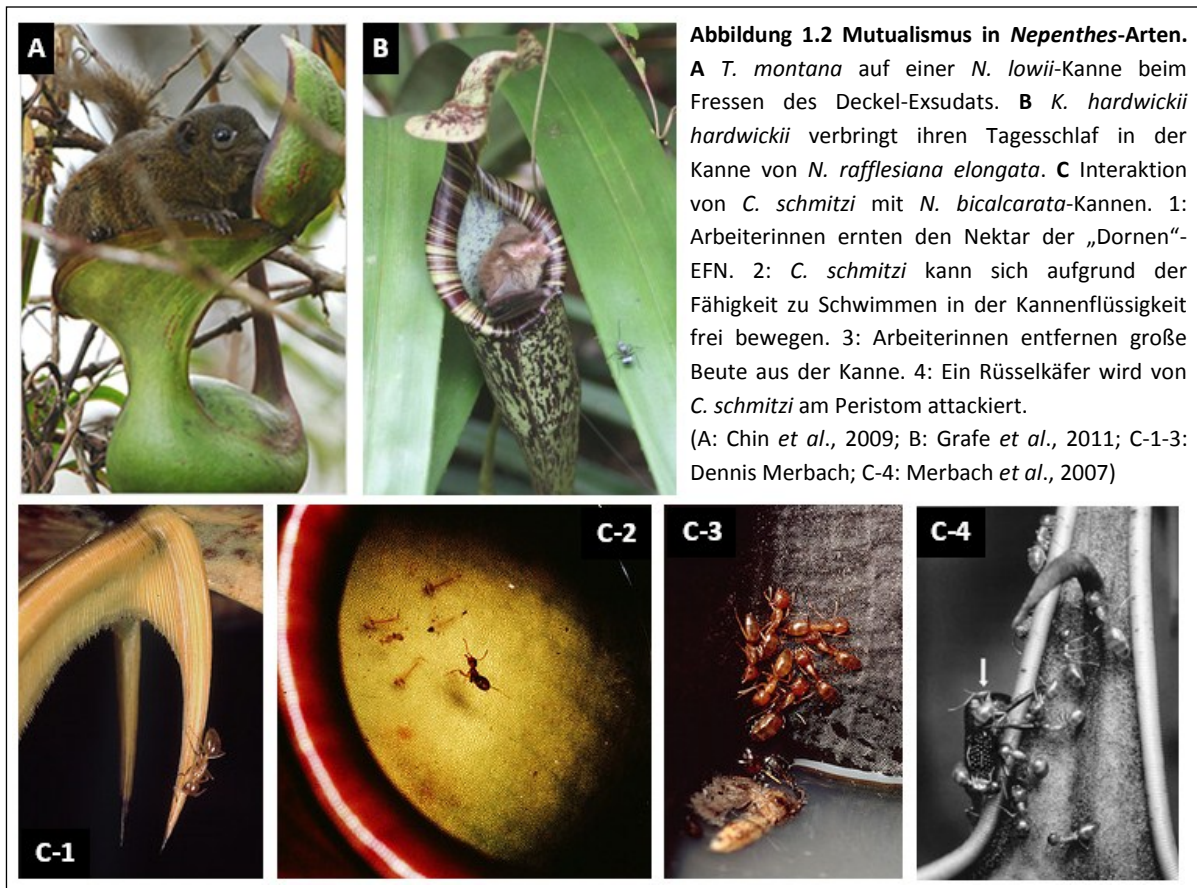
### Alternative Nährstoffquellen

Jedoch ergänzen *Nepenthes*-Kannen ihren Nährstoffhaushalt nicht ausschließlich mit Arthropoden, sondern auch aus nicht-karnivoren Quellen. Beispielsweise produziert *N. ampullaria* Jack zahlreiche den Boden bedeckende Kannen, welche Laub zersetzen und damit einen Großteil (35 %) des benötigten Stickstoffs beziehen (Cresswell, 1998; Moran *et al.*, 2003; Pavlovič *et al.*, 2011).

Junge *N. lowii* Hook.f.-Pflanzen bilden Bodenkannen typischer Struktur mit der Funktion Arthropoden zu fangen. Diese Fähigkeit geht mit der Bildung der Luftkannen verloren. Diese sind stark lignifiziert und der Kannendeckel steht weit von der ungewöhnlich breiten Öffnung ab. An der Innenseite des Deckels befinden sich raue Borsten und spezialisierte Nektardrüsen, welche ein buttriges, weißes Exsudat produzieren (Clarke *et al.*, 2009). Die Kannen enthalten eine große Menge Kot von Vertebraten. Es stellte sich heraus, dass sich das Bergspitzhörnchen *Tupaia montana* Thomas auf die Luftkannen setzt um vom Exsudat des Deckels zu fressen (Abb. 1.2, A). Dabei defäkiert es in die Kanne, wobei die Pflanze 57 bis 100 % ihres Stickstoffs über den Kot von *T. montana* gewinnt (Clarke *et al.*, 2009; Chin *et al.*, 2010; Moran & Clarke, 2010). Dieses Prinzip der Nährstoffgewinnung ist bisher auch bei zwei weiteren Gebirgsarten beobachtet worden, *N. rajah* Hook.f. und *N. macrophylla* Jebb & Cheek, wobei deren Luftkannen weiterhin die Funktion, Arthropoden zu fangen, behalten (Chin *et al.*, 2010). Die Grundlage der Beziehung zwischen *Nepenthes* und *T. montana* bildet die Morphologie der Kanne, d.h. nur Kannen mit großer Öffnung und einem Deckel, der konkav verlängert und im richtigen Winkel zur Öffnung steht, kommen in Frage (Chin *et al.*, 2010). Kürzlich wurde eine ähnliche Interaktion zwischen *N. rajah* und der Gipfel-Ratte (*Rattus baluensis* Thomas) beobachtet. Auch diese defäkiert während des Konsums des Exsudats in die Kanne, besucht diese aber im Gegensatz zum Spitzhörnchen meist nachts (Greenwood *et al.*, 2011).

Ein weiteres Beispiel, indem *Nepenthes*-Kannen ihren Stickstoffhaushalt mit Vertebraten-Kot aufbessern, ist *N. rafflesiana elongata* (Grafe *et al.*, 2011). Diese bildet enge, zylindrische Luftkannen, die viermal länger sind als die Kannen anderer Wachstumsformen von *N. rafflesiana*, und siebenmal weniger Insekten fangen (Gaume & DiGiusto, 2009). Die Hardwick-Wollfledermaus (*Kerivoula hardwickii hardwickii*) verbringt ihren Tagesschlaf gern in diesen Kannen (Abb. 1.2, B). Als Gegenleistung für den Schlafplatz gewinnt die Pflanze rund 34 % ihres Stickstoffs aus dem von der Fledermaus abgegebenen Kot und Urin (Grafe *et al.*, 2011).





Ein sehr interessantes Beispiel für ein mutualistisches Zusammenleben zwischen Ameise und Pflanze liefern *Camponotus schmitzi* Stärke und *N. bicalcarata* Hook.f. (Clarke & Kitching, 1995). Ein charakteristisches Merkmal der Kannen dieser Art sind Form und Struktur der Ranken, welche im apikalen Teil geschwollen und hohl sind und von *C. schmitzi* bewohnt werden. Zusätzlich zur Behausung bietet die Pflanze eine Fülle an Nektar, produziert von EFN, die sich in Form zweier Dornen unterhalb des Deckels zeigen (Abb. 1.2, C-1) (Merbach *et al.*, 2001). Somit bezieht die Ameise einmal Kohlenhydrate aus dem Nektar der Drüsen und, aufgrund der Fähigkeit zu schwimmen (Abb. 1.2, C-2), auch Proteine aus der von den Kannen gefangenen Beute. Lange wurde gerätselt, was die Gegenleistung von *C. schmitzi* an seinen Wirt ist. Zum einen wurde die Möglichkeit des Entfernens zu großer Beute aus der Kanne (Abb. 1.2, C-3) diskutiert, welche die Verdauungsaktivität dieser überfordern könnte und zum Absterben der Kanne führen würde (Clarke & Kitching, 1995). Zum anderen greift *C. schmitzi* selektiv und aggressiv den Rüsselkäfer (*Alcidodes* sp., Curculionidae) an, jedoch keine anderen Besucher der Kanne, wahrscheinlich weil diese potentielle Beute darstellen (Abb. 1.2, C-4). Der Rüsselkäfer richtet, durch das Fressen an Blättern und den sich entwickelnden Kannen, sehr großen Schaden bei *N. bicalcarata* an, die im Gegensatz zu anderen *Nepenthes*-Arten nur eine geringe Anzahl an Kannen produziert (Merbach *et al.*, 2007). Erst kürzlich wurde entdeckt, dass *C. schmitzi* außerdem am Beutefang, sowie an deren Verdauung beteiligt ist (Bonhomme *et al.*, 2011(A)). Die Ameise reagiert zwar nicht aggressiv auf Besucher der Pflanze, verhindert aber aktiv ein Entkommen der Beute aus der Kanne. Außerdem hilft *C. schmitzi* durch den Verzehr eines Teils der Beute beim Zersetzen dieser. Die nicht-metabolisierten Reste werden dann in die Kanne fallen gelassen. Weiterhin profitiert *N.*

*bicalcarata* womöglich auch von direkter Myrmecotrophie, da oft tote *C. schmitzi*-Ameisen in den Kannen gefunden wurden (Bonhomme et al., 2011(A)).

Neben invertebrater Beute gibt es auch Berichte über Vertebraten, die in den Kannen zersetzt werden. Beispielsweise wurde der Verdau von Mäusen in einer *N. truncata* Macfarl.-Pflanze beobachtet. Diese waren wahrscheinlich beim Konsumieren des sich auf dem Deckel befindenden Nektars vom Peristom abrutscht und in die Kanne gefallen. Die Zersetzung der Mäuse erfolgte über mehrere Monate und war, bis auf Fell, Nagezähne und einem Rest des Schädels, fast vollständig. Außerdem konnte durch den Verdau der Vertebraten eine Zunahme der Größe späterer Kannen verzeichnet werden (Hartmeyer & Hartmeyer, 2007 & 2009).

### Der Verdauungsprozess

Um die Nährstoffe aus nicht-karnivoren und karnivoren Quellen freizusetzen, weist das Kannensekret enzymatische Aktivität auf. Junge, noch geschlossene Kannen produzieren ein Sekret (Owen & Lennon, 1999; Owen et al., 1999), indem sich die Aktivitäten von Enzymen, wie Peptidasen, Proteinasen, Phosphatasen, Esterasen, Glucanasen, Ribonukleasen und Chitinasen nachweisen lassen (Jentsch et al., 1989; An et al., 2002; Athauda et al., 2004; Takahashi et al., 2005; Plachno et al., 2006; Stephenson & Hogan, 2006; Eilenberg et al., 2006; Hatano & Hamada, 2008; Thornhill et al., 2008; Mithöfer, 2011). Die Produktion der Flüssigkeit, die Expression und Sekretion der hydrolytischen Enzyme und anderer Proteine, sowie die Absorption der freigesetzten Nährstoffe (Owen et al., 1999; Moran & Clarke, 2010; Mithöfer, 2011) bewerkstelligen multizelluläre Drüsen, welche zahlreich die innere Zellwand der Verdauungszone auskleiden (Gorb et al., 2004; Plachno et al., 2006; Thronhill et al., 2008; Rottloff et al., 2009). Außerdem können die Drüsen freie Radikale bilden, welche die Zersetzung des Gewebes der Beute fördern können (Chia et al., 2004; Moran & Clarke, 2011). Zudem wurde ein TLP (*Thaumatin-like protein*) in der Flüssigkeit nachgewiesen (Hatano & Hamada, 2008; Rottloff et al., 2009), dass in einigen Pflanzen antimikrobielle Aktivität zeigt (Liu et al., 2010). Auch Sekundärmetabolite wurden aus verschiedenen Geweben von *Nepenthes* beschrieben (Bringmann et al., 2000; Aung et al., 2001; Rischer et al., 2002), jedoch nur Eilenberg et al. (2010) konnte das Vorkommen dieser im Verdauungsssekret zeigen. Er identifizierte zwei Naphthoquinone aus der Flüssigkeit von *N. khasiana*-Kannen, Droseron (3,5-Dihydroxy-2-Methoxy-1,4-Naphthoquinon) und sein Derivat 5-O-Methylhydroseron (2-Methyl-3-Hydroxy-5-Methoxy-1,4-Naphthoquinon), die nach der Zugabe von Chitin auftraten. Beide Komponenten hemmten in Bioassays das Wachstum von Pilzmyzel bzw. die Sporenbildung bekannter Pflanzenpathogene, wie *Botrytis cinerea* und *Alternaria solani*, zeigten aber auch Wirkung auf Humanpathogene, wie *Aspergillus fumigatus* und *Candida spp.* (Eilenberg et al., 2010; Mithöfer, 2011; Raj et al., 2011).

In älteren Kannen schalten die Drüsen von der Proteinproduktion zur Aufnahme der durch die enzymatische Spaltung erhaltenen Produkte um (Owen & Lennon, 1999; Owen et al., 1999; Moran & Clarke, 2010). Stickstoff wird z.B. in Form von Ammonium-Ionen, Aminosäuren (AS) oder Peptiden aufgenommen (Schulze et al., 1999; Rischer et al., 2002). Das pH-Optimum der Enzyme, das oft im sauren Bereich liegt, wird durch Protonenpumpen gewährleistet (Higashi et al., 1993; An et al., 2001; Moran et al., 2010; Moran & Clarke, 2010).

Die meisten Proteine, die in der Kannenflüssigkeit gefunden wurden, gehören zur Familie der PR-Proteine. Dies ist nicht überraschend, da viele PR-Proteine hydrolytische Aktivität besitzen,

welche gegen mikrobielle Angreifer in der Pflanzen-Pathogen-Interaktion gerichtet ist (siehe Abschnitt 1.1). Dieselbe Aktivität ist für den Verdauungsprozess der Beute vonnöten, was eine Veränderung der physiologischen Relevanz dieser Proteine bedeuten könnte (Mithöfer, 2011).

### 1.3 PR- (*pathogenesis-related*) Proteine

Im Abschnitt 1.1 wurde beschrieben, welche präformierten, physikochemischen Barrieren (z.B. morphologische Barrieren, Sekundärmetabolite, antimikrobielle Proteine) ein potentiell, mikrobielles Pathogen überwinden muss, um eine Pflanze erfolgreich zu infizieren. Nach einer Invasion werden Induktoren vom Pathogen freigesetzt, die eine weitere Abwehr seitens der Pflanze hervorrufen, u.a. die Synthese abwehrabhängiger Proteine (Slusarenko *et al.*, 2000). Diese induzierbaren Proteine nehmen an der aktiven Abwehr teil und spielen eine mögliche Rolle in der Verhinderung der Pathogen-Entwicklung und dessen Verbreitung. Viele dieser abwehrabhängigen Proteine entsprechen den PR-Proteinen oder sind Produkte sogenannter SAR-Gene (Van Loon & Van Strien, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Die Nomenklatur der PR-Proteine wurde schon 1994, anhand ihrer Charakteristika als Pflanzenproteine, die in pathologischen oder ähnlichen Situationen induziert werden, klassifiziert (Van Loon *et al.*, 1994). Die Bezeichnung PR-Proteine bezieht sich auf alle durch Mikroben induzierte Proteine. Allerdings wird eine Vielzahl von Enzymaktivitäten nach einem Angriff eines Pathogens erhöht, die dadurch ebenfalls eine Rolle in der Abwehr spielen können (Van Loon *et al.*, 2006). Deswegen wird nur bei Proteinen, die nur schwach oder gar nicht in gesunden Geweben detektiert werden können und einer Induktion auf Proteinebene nach Infektion eines oder mehrerer Pathogene bedürfen, von induzierbaren, abwehrspezifischen Proteinen gesprochen. Diese beinhalten die bekannten Familien der PR-Proteine (Tabelle 1.2), aber auch nichtklassifizierte Proteine, die das oben genannte Kriterium erfüllen. Diese Proteine sind abwehrabhängig, da sie in Assoziation mit der Resistenzantwort induziert werden, ohne unbedingt eine funktionelle Rolle in der Abwehr haben zu müssen (Van Loon *et al.*, 2006).

Mindestens 113 Proteinfamilien werden in Abhängigkeit von Abwehrreaktionen aufgrund von Infektionen von Oomyceten, Pilzen, Bakterien, Viren oder Viroiden, sowie nach Angriff von Insekten oder Nematoden induziert (Van Loon & Van Strien, 1999). PRs wurden zahlreich beschrieben und sind momentan in 17 Familien zusammengefasst (Tabelle 1.2). Die Nummerierung erfolgte in der Reihenfolge der Entdeckung der jeweiligen Proteine. Ein Vertreter jeder Familie, der Erste oder Bekannteste, wurde ausgewählt und die Familie wurde anhand diesem biochemisch und biologisch weiter charakterisiert (Van Loon *et al.*, 2006). Die Wirkungsweise von Vertretern einiger Familien ist die Begrenzung der Aktivität, des Wachstums und der Verbreitung von Pathogenen. Zu diesen zählt u.a. die PR-2-Familie, deren Mitglieder  $\beta$ -1,3-Endoglucanasen sind und die Familien PR-3, -4, -8 und -11, welche Chitinasen darstellen. Beide können gegen Pilzwachstum wirken. Chitinasen und Proteinase-Inhibitoren (PR-6) haben Nematoden und herbivore Insekten als Ziel. Mitglieder der PR-8-Familie können außerdem Lysozym-Aktivität besitzen und gegen Bakterien wirken, wobei Defensine (PR-12) (Thomma *et al.*, 2002; Lay & Anderson, 2005) und Thionine (PR-13) (Bohlmann, 1994; Epple *et al.*, 1997) ein breites antimikrobielles Spektrum aufweisen. Auch einige Lipid-Transfer-Proteine (PR-14) besitzen antimikrobielle Wirkung (García-Olmedo *et al.*, 1994) und den Mitgliedern der Familien PR-1 und

PR-5 wird eine Wirkung gegen Oomyzeten zugeschrieben. Das PR-1-Protein wird oft als Marker für einen erhöhten Abwehrstatus durch die Pathogen-induzierte SAR genutzt, wobei die biologische Aktivität noch ungeklärt ist (Van Loon & Van Strien, 1999).

<i>Familie</i>	<i>Typ</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Gensymbol</i>	<i>Referenz</i>
PR-1	PR-1a (Tabak)	antimykotisch	<i>Ypr1</i>	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-2	PR-2 (Tabak)	$\beta$ -1,3-Glukanase	<i>Ypr2</i> , [ <i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-3	P, Q (Tabak)	Chitinase (I, II, IV, V, VI, VII)	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>	Van Loon, 1982
PR-4	'R' (Tabak)	Chitinase (I, II)	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>	Van Loon, 1982
PR-5	S (Tabak)	TLP (Thaumatococcus-like)	<i>Ypr5</i>	Van Loon, 1982
PR-6	Inhibitor I (Tomate)	Proteinase-Inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pirl</i> ')	Green & Ryan, 1972
PR-7	P <sub>69</sub> (Tomate)	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>	Vera & Conejero, 1988
PR-8	Chitinase (Gurke)	Chitinase (III)	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>	Métraux <i>et al.</i> , 1988
PR-9	Lignin-formende Peroxidase (Tabak)	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>	Lagrimini <i>et al.</i> 1987
PR-10	'PR-1' (Petersilie)	Ribonuklease-ähnlich	<i>Ypr10</i>	Somssich <i>et al.</i> , 1986
PR-11	Chitinase Kl. V (Tabak)	Chitinase (I)	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>	Melchers <i>et al.</i> , 1994
PR-12	Rs-AFP3 (Rettich)	Defensin	<i>Ypr12</i>	Terras <i>et al.</i> , 1992
PR-13	THI2.1 (Arabidopsis)	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>	Epple <i>et al.</i> , 1995
PR-14	LTP4 (Gerste)	Lipid-Transfer-Protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>	García-Olmedo <i>et al.</i> , 1995
PR-15	OxOa, germin (Gerste)	Oxalat-Oxidase	<i>Ypr15</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1995
PR-16	OxOLP (Gerste)	Oxalat-Oxidase-ähnlich	<i>Ypr16</i>	Wei <i>et al.</i> , 1998
PR-17	PRp27 (Tabak)	unbekannt	<i>Ypr17</i>	Okushima <i>et al.</i> , 2000

**Tabelle 1.2 Anerkannte Familien der PR-Proteine.**

PR-7 ist eine Endopeptidase und das auffälligste PR-Protein in Tomate (Jordá *et al.*, 2000). Einen spezifischen Typ einer Peroxidase stellt PR-9 dar. Das Enzym kann an der Katalyse der Lignifizierung mitwirken, die bei der Verfestigung der Zellwand stattfindet (Passardi *et al.*, 2004) und die Resistenz gegen viele Pathogene erhöht. Proteine der PR-10-Familie zeigen Homologie zu Ribonukleasen und einige Mitglieder besitzen schwache Ribonuklease-Aktivität (Bufo *et al.*, 1996). Oft wird den PR-10-Proteinen eine Wirkung gegen Viren zugeschrieben (Park *et al.*, 2004), da keine anderen PR-Proteine einen direkten und spezifischen Effekt auf diese zu haben scheinen. Allerdings besitzt ein PR-4-ähnliches Protein aus Weizen ebenfalls Ribonuklease-Aktivität (Caporale *et al.*, 2004). Die Familien PR-15, -16 und -17 wurden erst kürzlich den PR-Proteinen hinzugefügt, wobei PR-15 und -16 Oxalat-Oxidasen bzw. ähnliche Proteine mit Superoxid-Dismutase-Aktivität sind (Bernier & Berna, 2001). Diese Proteine bilden Wasserstoffperoxid, welches toxisch auf verschiedene Typen von Angreifern wirkt bzw. direkt oder indirekt Pflanzenabwehrreaktionen stimulieren kann (Donaldson *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003). PR-17-Proteine wurden in infizierten Tabak-, Weizen- und Gerste-Pflanzen gefunden. Ihre Sequenzen spiegeln das aktive Zentrum von Zink-Metallo-Proteinasen wieder (Christensen *et al.* 2002), konnten aber bisher nicht weiter charakterisiert werden. Eine putative PR-18-Familie beinhaltet Pilz- und SA-induzierbare Kohlenhydrat-Oxidasen, wie an Proteinen aus Sonnenblumen gezeigt wurde, die Wasserstoffperoxid-bildende und antimikrobielle Eigenschaften zeigen (Custers *et al.*, 2004). Nicht alle Familien scheinen in jeder Pflanzenart präsent zu sein. Das Vorkommen und die Eigenschaften der verschiedenen Mitglieder einer Familie können stark abweichen.

PR-10-Proteine sind bisher die einzige Familie, deren Mitglieder aufgrund eines fehlenden Signalpeptids zytoplasmatisch sind. Die meisten PR-Proteine weisen ein Signalpeptid am N-Terminus auf, welches die Translokation ins Endoplasmatische Retikulum (ER) bewirkt, gefolgt von einer Sekretion in den Apoplasten, wo diese extrazellulär akkumulieren. Einige Proteine werden mit einem zusätzlichen Signalpeptid gebildet, welches für den Transport in die Vakuole verantwortlich ist (Van Loon *et al.*, 2006).

#### *PR-Proteine im Nepenthes-Verdauungssekret*

Wie oben erwähnt, können die bisher aus dem Verdauungssekret identifizierten Proteine PR-Familien zugeordnet werden (Tabelle 1.3). Auch hier weisen die meisten Proteine ein Signalpeptid am N-Terminus auf, was der Sekretion in die Kannenflüssigkeit dient. Schon sehr früh wurde die Aktivität von Proteinasen und Transaminasen im Sekret geschlossener Kannen nachgewiesen (Lüttge, 1964). Nepenthacin, eine saure Proteinase mit starker Ähnlichkeit zu Pepsin, wurde außerdem beschrieben (Jentsch *et al.*, 1989). Die Expression zweier Aspartat-Proteinasen konnte in Drüsenzellen von *N. alata* nachgewiesen werden (An *et al.*, 2002), die allerdings ein Zielsignal für die Vakuole enthalten. Zwei weitere Aspartat-Proteinasen (PR-7), Nepenthesin Typ I und II, wurden für *N. distillatoria* und *N. gracilis* beschrieben und werden in den Drüsen-umgebenden Zellen exprimiert (Athauda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2005).

<i>Familie</i>	<i>Typ</i>	<i>Art</i>	<i>Akzession-Nr.</i>	<i>Referenz</i>
PR-1	PR-1	<i>N. mirabilis</i>	ACT99721	nicht publiziert
PR-2	Glucanase	<i>N. khasiana</i>	ABB89525	nicht publiziert
PR-3	Chitinase Klasse I	<i>N. khasiana</i>	AAT40733	Eilenberg <i>et al.</i> , 2006
	Chitinase Klasse IV	<i>N. alata</i>	BAF98919	Hatano & Hamada, 2008
PR-5	TLP	<i>N. singalana</i>	ACU31849	Rottloff <i>et al.</i> , 2009
	TLP	<i>N. alata</i>	BAF98918	Hatano & Hamada, 2008
PR-7	Nepenthesin Typ I	<i>N. gracilis</i>	BAD07474	Athauda <i>et al.</i> , 2004
	Nepenthesin Typ II	<i>N. gracilis</i>	BAD07475	Athauda <i>et al.</i> , 2004
PR-8	Chitinase Klasse III	<i>N. singalana</i>	ACU31853	Rottloff <i>et al.</i> , 2009
PR-10	Ribonuklease	<i>N. ventricosa</i>	/	Stephenson & Hogan, 2006

**Tabelle 1.3 *Nepenthes*-Verdauungsproteine, die den Familien der PR-Proteine zugeordnet werden können.**

Weiterhin konnte die Aktivität einer Cystein-Proteinase in der Flüssigkeit von *N. ventricosa*-Kannen nachgewiesen und eine cDNA-Sequenz kodierend für eine putative Cystein-Proteinase mit vorausgesagten Signalpeptid zur Sekretion kloniert werden (Stephenson & Hogan, 2006). Zusätzlich konnten auch andere hydrolytische Enzyme, wie Ribonukleasen (PR-10) (Matthews, 1960; Stephenson & Hogan, 2006), Chitinasen (PR-3, -4 & -8) (Eilenberg *et al.*, 2006; Hatano & Hamada, 2008, Rottloff *et al.*, 2009 & 2011) und Glucanasen (PR-2), im Verdauungssekret nachgewiesen werden. Von einer Glucanase war bisher nur die Sequenz aus *N. khasiana*



(ABB89525) bekannt. Über einen proteomischen Ansatz konnte jedoch eine  $\beta$ -1,3-Glucanase in der Kannenflüssigkeit detektiert werden. Dabei wurde außerdem eine  $\beta$ -D-Xylosidase nachgewiesen (Hatano & Hamada, 2008). Neben hydrolytischen Enzymen konnten auch Proteine mit antimikrobieller Wirkung, wie ein PR-1-Protein (PR-1) aus *N. mirabilis* (ACT99721; Dipl.-Arbeit, Matthias Rott, 2009) und ein TLP (PR-5) aus *N. singalana* (Rottloff *et al.*, 2009) und *N. alata* (Hatano & Hamada, 2008), im Kannensekret nachgewiesen werden. Da in dieser Arbeit ein TLP und eine Chitinase charakterisiert werden sollen, sind diese in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

### 1.3.1 Thaumatin-like proteins (TLPs)

TLPs (*Thaumatin-like proteins*) sind etwa 200 AS lange Polypeptide, die eine hohe Sequenzähnlichkeit mit Thaumatin, einem süß schmeckenden Protein, welches erstmals in der Frucht des Busches *Thaumatococcus daniellii* Benth. gefunden wurde (Van der Wel & Loewe, 1972). In der letzten Dekade wurden TLPs in einer großen Auswahl von Organismen entdeckt (Shatters *et al.*, 2006), z.B. in Nematoden (Kitajima & Sato, 1999), Insekten (Brandazza *et al.*, 2004), Pilzen (Grenier *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2006) und Pflanzen (Liu *et al.*, 2010). In Letzteren sind TLPs universell und kommen in Gymnospermen, Angiospermen und Bryophyten vor. Viele TLPs haben eine Familien-Signatur (Thaumatin\_1, Prosite-Nr. PS00316: G-x-[GF]-x-T-[GA]-D-C-x(1,2)-[GQ]-x(2,3)-C) (Jami *et al.*, 2007; Tachi *et al.*, 2009). Die meisten TLPs haben ein Molekulargewicht von 21 bis 26 kDa, besitzen 16 konservierte Cystein-Reste und werden als große (*large*, L-Typ) TLPs bezeichnet. Eine geringere Anzahl gehört zu den kleinen (*small*, S-Typ) TLPs, die meist in Koniferen und Getreide vorkommen. Diese haben, aufgrund einer Peptid-Deletion, ein Molekulargewicht von 16 bis 17 kDa und nur 10 konservierte Cystein-Reste (Liu *et al.*, 2010). Die konservierten Cystein-Reste bilden Disulfidbindungen, die das Molekül festigen und ihm eine hohe Stabilität gegenüber extremen Temperaturen und pH-Bereichen verleihen, sowie eine Spaltung durch Proteasen verhindert (Smole *et al.*, 2008).

Diese Proteine werden zur PR-5-Familie gezählt, da ihre Expression durch verschiedene Stresssituationen induziert werden kann. Dazu gehören Dürre, Verwundung und Kälte, sowie die Invasion von Pathogenen und der Befall durch Schädlinge (Van Loon *et al.*, 2006). Die Funktion dieser Proteine variiert und wird vielseitig diskutiert. Verschiedene Mitglieder der Pflanzen-TLP-Superfamilie sind Allergene aus Früchten oder Pollen (Hoffmann-Sommergruber, 2002; Breiteneder, 2004). Zeamatin, ein TLP aus Mais (*Zea mays* L.), wird auch Permatin genannt, da es Membranporen bildet (Roberts & Selitrennikoff, 1990). Außerdem wird vielen TLPs antimykotische Aktivität zugeschrieben, wie z.B. die Inhibierung des Wachstums von *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* und *Physalospora piricola* (Vigers *et al.*, 1992; Chu & Ng, 2003). Dabei wird diskutiert, ob dies über Glucanase-Aktivität einiger TLPs oder über eine Interaktion mit Komponenten der Zelloberfläche des Pathogens geschieht (Liu *et al.*, 2010). Oft können TLPs wasserlösliches Glucan, ein wichtiger Bestandteil der Pilzzellwand, binden, wobei eine Rezeptor-vermittelte, antimykotische Wirkung vermutet wird (Trudel *et al.*, 1998, Grenier *et al.*, 1999 & 2000). Andere Proteine dieser Familie zeigen weitere Eigenschaften, die bisher aber nur in Einzelfällen beschrieben wurden. Ein Beispiel ist das TLX1 aus Weizen (*Triticum aestivum*), welches Xylanasen inhibiert, die von Pflanzen und Mikroorganismen gebildet werden (Fierens *et al.*, 2007 & 2009). Zeamatin besitzt neben seiner antimykotischen und

Membran-permeabilisierenden Wirkung auch die Eigenschaft  $\alpha$ -Amylasen und Trypsin zu inhibieren (Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2001). Das Verständnis der antimykotischen Aktivität bzw. anderer seltener auftretender Funktionen der TLPs ist noch unvollständig und wird noch diskutiert (Liu *et al.*, 2010).

### 1.3.2 Pflanzenchitinasen

Chitinasen (EC 3.2.1.14) sind hydrolytische Enzyme, welche die Spaltung von  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen in biopolymeren *N*-Acetylglucosaminen, v.a. Chitin, katalysieren. Diese Proteine sind in allen Organismen-Hauptgruppen (Eubakterien, Archaea, Pilzen, Pflanzen und Tieren) vorhanden und nehmen dort verschiedene Funktionen ein. Bakterielle Chitinasen sind meist an Ernährungsprozessen beteiligt, wo diese Chitin zersetzen und den Zellen Kohlenstoff und Stickstoff bereitstellen. In Hefen und verschiedenen Pilzen sind die Enzyme an der Morphogenese, z.B. beim Umbau der Zellwandstruktur, beteiligt (Kasprzewska, 2003). In Tieren und Pflanzen spielen Chitinasen hauptsächlich eine Rolle in der Pathogenabwehr (Patil *et al.*, 2000). Die Enzyme werden in Exo- und Endochitinasen unterteilt. Erstere binden an das nicht-reduzierende Ende der Chitin-Kette und spaltet dort Monomere ab. Endochitinasen hydrolysieren interne Bindungen und setzen Oligomere (2 bis 6 *N*-Acetylglucosamin-Einheiten) frei. Die Chitinasen gehören zu den Glykosidhydrolasen der Familien 18 und 19 und sind in höheren Pflanzen in sieben Klassen, mit III und V (Familie 18) und I, II, IV, VI und VII (Familie 19) zusammengefasst (CAZy-Datenbank) (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993; Kasprzewska 2003; Cantarel *et al.* 2008), die sich in Proteinstruktur, Substratspezifität, Katalyse-Mechanismus und Sensitivität gegenüber Inhibitoren unterscheiden.

Auch im *Nepenthes*-Verdauungssekret wurden Chitinasen verschiedener Klassen gefunden, was nicht verwunderlich ist, da Insekten einen Großteil der gefangenen Beute darstellen (Mithöfer, 2011). Im Verdauungssekret von *N. khasiana* konnte Exo- und Endochitinase-Aktivität gefunden werden. Diese ist schon in geschlossenen Kannen messbar, kann aber auch durch Zugabe von Chitin induziert werden. Weiterhin wurden vier Gene (*Nkchit1b*-1 & -2, *Nkchit2b*-1 & -2) isoliert, die zu zwei Subgruppen basischer Chitinasen der Klasse I gehören. Durch Sequenzanalysen konnte hier gezeigt werden, dass nur *Nkchit1b* in die Kannenflüssigkeit sekretiert wird, da *Nkchit2b* ein Signalpeptid für den Transport in die Vakuole besitzt (Eilenberg *et al.*, 2006). Eine weitere putative Chitinase der Klasse IV wurde aus dem Sekret von *N. alata*-Kannen identifiziert, wobei aber die enzymatische Aktivität nicht überprüft wurde (Hatano & Hamada, 2008). In unserem Arbeitskreis (Dipl.-Arbeit, Regina Stieber, 2006) konnte die Sequenz einer putativen Chitinase der Klasse III, welche zur Familie 18 der Glycosidhydrolasen zählt, isoliert werden. Diese soll in der hier vorliegenden Arbeit weiter untersucht und charakterisiert werden.

### 1.3 Zielsetzung

Echte karnivore Pflanzen besitzen Fallen, mit der Beute angelockt, gefangen und verdaut wird und die dabei freigesetzten Nährstoffe aktiv aufgenommen werden. In der Gattung *Nepenthes* geschieht dies in den sogenannten Gleitfallen. Die Kannen enthalten eine Flüssigkeit, in der schon sehr früh die Aktivität verschiedener hydrolytischer Enzyme nachgewiesen wurde. Allerdings sind

nur von einer geringen Anzahl die Sequenzen bekannt und wenige dieser Proteine wurden biochemisch charakterisiert. In unserer Arbeitsgruppe wurden im Vorfeld in Diplomarbeiten durch einen proteomischen Ansatz, kombiniert mit molekularbiologischen Analysen, die cDNA-Sequenzen eines PR-1-Proteins (Rott, 2009), eines TLPs (Rottloff, 2006) und einer Chitinase (Stieber, 2006) identifiziert. Die Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen des TLP und der Chitinase sollten im Rahmen dieser Arbeit strukturell analysiert werden. Ein weiterer Punkt ist die heterologe Expression beider Proteine um diese biochemisch charakterisieren zu können. Die Aufklärung der biologischen Funktion ist sehr interessant, da es sich zum einem bei der Chitinase um ein hydrolytisches Enzym handelt, welches höchstwahrscheinlich eine Rolle in der Zersetzung der Beute spielt. Zum anderen stellt das TLP ein Protein dar, welches, trotz der zahlreichen Diskussionen über dessen Funktion, in vielen Pflanzenarten oft mit einer antimykotischen Wirkungsweise in Verbindung gebracht wird. Solch eine Aktivität wäre in der Kannenflüssigkeit sehr gut geeignet um eventuelle Nährstoffkonkurrenten auszuschalten. Hydrolytische Eigenschaften des Proteins wurden bisher selten und nur in Form von  $\beta$ -1,3-Glucanase-Aktivität beschrieben. Diese wäre bei der Verdauung der Beute von Nutzen. Allerdings scheinen geringfügige Mutationen zu einer Veränderung der biologischen Eigenschaften zu führen, trotz der hohen Sequenzähnlichkeit der TLPs innerhalb verschiedener Organismen. Somit könnte das TLP auch eine andere Rolle im Verdauungssekret einnehmen. In dieser Arbeit sollten sowohl antimikrobielle als auch hydrolytische Eigenschaften des Proteins überprüft werden.

Da das TLP und die Chitinase aus dem Verdauungssekret isoliert wurden, wäre es interessant aufzuklären, ob deren Expression z.B. durch Beutefang induzierbar ist. Dies könnte über *Real-time* PCR überprüft werden. Dazu sollte diese Methode für *Nepenthes*-Arten etabliert werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Proteine keine oder nur eine „zufällige“ Beteiligung am Zersetzungsprozess der Beute haben. Wie auch andere aus dem Kannensekret identifizierte Enzyme gehören das TLP und die Chitinase zu den PR-Proteinen, deren Expression durch Pathogenbefall induziert wird. Allerdings ist auch eine Verschiebung der Funktionalität der Proteine denkbar, womit diese eine Rolle in der Nährstoffspaltung einnehmen statt in der Pathogenabwehr einnehmen. Über das Einführen verschiedener möglicher Induktoren (z.B. Mikroorganismen oder Insekten) in die Kannenflüssigkeit könnte getestet werden, ob diese einen Einfluss auf die Expression der Proteine haben.

In der Literatur werden die sekretorischen Zellen der Drüsen als Produzenten der Verdauungsproteine diskutiert. Dies wurde jedoch bisher noch nicht bestätigt. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Präparationsmethode entwickelt werden, mit der die Drüsen isoliert werden können. Damit wäre es auch möglich neben dem Nachweis der Transkripte bekannter *Nepenthes*-Verdauungsproteine das Expressionsmuster der Drüsen nach verschiedenen Induktionsversuchen durch z.B. AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) zu untersuchen. Über diesen Ansatz könnten auch weitere Proteine identifiziert werden, die u.a. an der Verdauung und der Nährstoffaufnahme beteiligt sind.



## Material und Methoden

## 2

## 2.1 Materialien

## 2.1.1 Puffer und Chemikalien

Chemikalien, Puffer- und Medienbestandteile wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe) bzw. Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in mindestens p. a. Qualität bezogen. In der Arbeit kamen verschiedene Puffer zum Einsatz. Diese sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1 Verwendete Puffersysteme.	
Puffer-Bezeichnung	Verwendete pH-Werte
Natriumacetat	3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5
MES (2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure)	5,5; 6,0; 6,5
Natriumphosphat	5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansäure)	6,5; 7,0; 7,5
Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan)	7,5; 8,0; 8,5; 9,0

## 2.1.2 Vektoren

In der Arbeit wurden verschiedene Vektoren zur Klonierung von PCR- (*polymerase chain reaction*) Produkten, sowie zur heterologen Expression von Proteinen verwendet (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2a Auflistung der in der Arbeit verwendeten Vektoren.	
Bezeichnung	Charakteristika
<i>Klonierungsvektoren</i>	
<sup>1</sup> pCR®-Blunt II-TOPO®	3,5 kb; Km <sup>R</sup> ; Zc <sup>R</sup> ; pUC <i>origin</i> ; <i>lacZα</i> ; <i>lac</i> -Promotor; <i>ccd lethal gene</i> ; TOPO®-cloning site
<i>Expressionsplasmide</i>	
<sup>2</sup> pQE-30	3,4 kb; Amp <sup>R</sup> ; ColE1 <i>origin</i> ; T5-Promotor/ <i>lac</i> -Operator; 6xHis-Tag (N-Terminus)
<sup>2</sup> pQE-16	4,0 kb; Amp <sup>R</sup> ; ColE1 <i>origin</i> ; T5-Promotor/ <i>lac</i> -Operator; DHFR; 6xHis-Tag (C-Terminus)
<sup>2</sup> pQE-70	3,4 kb; Amp <sup>R</sup> ; ColE1 <i>origin</i> ; T5-Promotor/ <i>lac</i> -Operator; 6xHis-Tag (C-Terminus)
<sup>3</sup> pET-28b	5,4 kb; Km <sup>R</sup> ; f1 & pBR322 <i>origin</i> ; T7-Promotor; <i>lacI</i> ; 6xHis-Tag (N-Terminus); T7-Tag
<sup>3</sup> pET-29b	5,4 kb; Km <sup>R</sup> ; f1 & pBR322 <i>origin</i> ; T7-Promotor; <i>lacI</i> ; 6xHis-Tag (N-Terminus); S-Tag
pHIS-8-3	5,5 kb; Km <sup>R</sup> ; f1 & pBR322 <i>origin</i> ; T7-Promotor; <i>lacI</i> ; 8xHis-Tag (N-Terminus); T7-Tag; modifizierter <sup>3</sup> pET-28a-Vektor (Jez <i>et al.</i> , 2008)
<sup>1</sup> Invitrogen (Darmstadt), <sup>2</sup> QIAGEN (Hilden), <sup>3</sup> Novagen® Merck4Biosciences (Darmstadt)	

Tabelle 2.2b Auflistung der in der Arbeit verwendeten Vektoren.

Bezeichnung	Charakteristika
<i>Chaperon-kodierende Plasmide</i>	
<sup>1</sup> pG-KJE8	11,1 kb; Cm <sup>R</sup> ; pACYC origin; araB- & Pzt1-Promotor; dnaK-dnaJ-grpE; groES-groEL
<sup>1</sup> pGro7	5,4 kb; Cm <sup>R</sup> ; pACYC origin; araB-Promotor; groES-groEL
<sup>1</sup> pKJE7	7,2 kb; Cm <sup>R</sup> ; pACYC origin; araB-Promotor; dnaK-dnaJ-grpE
<sup>1</sup> pGTf2	8,3 kb; Cm <sup>R</sup> ; pACYC origin; Pzt1-Promotor; groES-groEL-tig
<sup>1</sup> pTf16	5,4 kb; Cm <sup>R</sup> ; pACYC origin; araB-Promotor; tig
<sup>1</sup> Takara Bio Europe (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)	

### 2.1.3 Organismen

Tabelle 2.3a Auflistung der in der Arbeit verwendeten Organismen.

<i>Insekten</i>	
Bezeichnung	Herkunft
<i>Drosophila melanogaster</i>	Dr. Markus Knaden, Abteilung Neuroethologie, MPI für Chemische Ökologie, Jena
<i>Nepenthes-Arten</i>	
<i>N. alata</i> Blanco*	<i>N. mirabilis</i> (Lour.) Druce*
<i>N. ampullaria</i> Jack**	<i>N. fusca</i> Danser**
<i>N. gracilis</i> Korth.**	<i>N. khasiana</i> Hook.f.**
<i>N. maxima</i> Reinw. ex Nees**	<i>N. reinwardtiana</i> Miq.**
<i>N. rafflesiana</i> Jack ex Hook.f.**	<i>N. rafflesiana</i> „Mizuho Kondo“***
<i>N. thorellii</i> Lecomte**	<i>N. truncata</i> Macfarl.**
<i>N. ventricosa</i> Blanco**	<i>N. x henryana</i> W. A. Nicholson**
<i>N. superba</i> hort. ex Flor.**	<i>N. singalana</i> Becc.**
<i>N. eustachya</i> Miq.**	<i>N. x wittei</i> **
* Gewächshaus, MPI für Chemische Ökologie, Jena; ** Botanischer Garten, Jena	
<i>Pilzstämme</i>	
Bezeichnung	Herkunft
<i>Fusarium oxysporum</i>	PP-FSU*
<i>Fusarium semitectum</i>	PP-FSU*
<i>Fusarium decemcellulare</i>	PP-FSU*
<i>Fusarium proliferatum</i>	PP-FSU*
<i>Cladosporium herbarum</i>	DSMZ** (Nr. 63422)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	DSMZ** (Nr. 1490)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ZIMET*** (Nr. 25158)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ZIMET*** (Nr. 25246)
*PP-FSU: Phytopathologie (TA Fr. Mitscherlich), Friedrich-Schiller-Universität, Jena; ** DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; *** Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut, Jena	

**Tabelle 2.3b Auflistung der in der Arbeit verwendeten Organismen.****Bakterienstämme**

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	PP-FSU* (Nr. 22d/93)
<b>E. coli-Stämme</b>	
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>E. coli</i> SG13009[pREP4]	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
<i>E. coli</i> One Shot® TOP10	Invitrogen GmbH, Darmstadt

\* PP-FSU: Phytopathologie (Dr. Beate Völksch), Friedrich-Schiller-Universität, Jena

**2.1.4 Oligonukleotide**

Alle verwendeten Primer wurden bei der Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg) synthetisiert. Die in der Tabelle (2.3) dargestellten Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) entsprechen den von der Firma angegebenen Temperaturen.

**Tabelle 2.4a Auflistung der in der Arbeit verwendeten Primer.**

Bezeichnung	Sequenz	$T_m$ [°C]
-------------	---------	------------

**Plasmid-spezifische Primer**

M13 rev (-29)	5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'	53,7
T7	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'	53,2
pQE for	5' - GTA TCA CGA GGC CCT TTC GTC T -3'	62,1
pQE rev	5' - CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG -3'	59,3

**Gen-spezifische Primer****NgTLP**

Tlp_sense	5' - CAA TGA GCC AAT TCA TAA AAT TCA TTG -3'	57,4
Tlp_antisense	5' - CAG TTA TAC TTT AAG GGC AAA ACA CAA C -3'	60,7

**NrChit1**

EChit_sense	5' - ATG AAG ACC CAT TAT TCA TCA GCA ATT C -3'	60,7
EChit_antisense	5' - TTA AAC ACT ATC CTT GAT AGC TGA G -3'	58,1

**NmAct**

ActinF	5' - ACC GAA GCC CCT CTT AAC CC -3'	61,4
ActinR	5' - GTA TGG CTG ACA CCA TCA CC -3'	59,4

**Nm18SrRNA**

18SrRNA_F	5' - CTG CGG CTT AAT TTG ACT CAA C -3'	58,4
18SrRNA_R	5' - GTT AGC AGG CTG AGG TCT C -3'	58,8

**Nm26SrRNA**

26SrRNA_F	5' - GTG GCC TAT CGA TCC TTT AGA C -3'	60,3
26SrRNA R	5' - GAA ATA AAT GGC ACG CAC TCA G -3'	58,4

**Tabelle 2.4b Auflistung der in der Arbeit verwendeten Primer.**

Grau unterlegte Nukleotide kennzeichnen eine *Bam*HI Schnittstelle, grün dargestellte Nukleotide zeigen die Restriktionsseite von *Hind*III.

#### Primer zur Klonierung in Expressionsvektoren

##### TLP

tlp_exp_sense1	5'-CGC GGA TCC AGC CAA TTC -3'	58,2
tlp_exp_sense2	5'-CGC GGA TCC GCC ACA TTT G -3'	61,0
tlp_exp_sense3	5'-CGC GGA TCC GAG CCA ATT C -3'	61,0
tlp_exp_sense4	5'-CGC GGA TCC GGC CAA TTC -3'	60,5
tlp_exp_antis1	5'-CGC AAG CTT TTA AGG GCA AAA C -3'	58,4
tlp_exp_antis2	5'-CGC AAG CTT AGG GCA AAA CAC -3'	59,8
tlp_exp_antis3	5'-CGC GGA TCC TTA AGG GCA AAA C -3'	62,1
tlp_exp_antis4	5'-CGC GGA TCC AGG GCA AAA CAC -3'	61,0

##### Chit1

chit_exp_sense1	5'-CGC GGA TCC AAG ACC CAT -3'	58,2
chit_exp_sense2	5'-CGC GGA TCC TCC GGC ATA -3'	60,5
chit_exp_antis1	5'-CGC AAG CTT TTA AAC ACT ATC ATC CTT G -3'	59,7
chit_exp_antis2	5'-CGC AAG CTT AAC ACT ATC CTT G -3'	58,4
chit_exp_antis3	5'-CGC GGA TCC TTA AAC ACT ATC CTT G -3'	63,0

#### Primer zur Identifizierung von Referenzgenen für die Real-time PCR

##### Actin

ActinF	5'-ACC GAA GCC CCT CTT AAC CC -3'	61,4
ActinR	5'-GTA TGG CTG ACA CCA TCA CC -3'	59,4

##### 26S rRNA

26SrRNA_F	5'-CCC CTC CTT TTG GCT CTA AG-3'	59,4
26SrRNA_R	5'-ACC CTT TTG TTC CAC ACG AGA T-3'	58,4

##### 18S rRNA

18SrRNA_F	5'-CTG CGG CTT AAT TTG ACT CAA C-3'	58,4
18SrRNA_R	5'-GTT AGC AGG CTG AGG TCT C-3'	58,8

##### UBQ-5

UBQ5_F	5'-CGG GAG AAA CCA CAG GTA AG-3'	59,4
UBQ5_R	5'-CTC CTT GTC CTG GAT CTT CG-3'	59,4

##### UBQ-10

UBQ10_F	5'-GTA ATC AGC CAG TTT GGT GGA G-3'	60,3
UBQ10_R	5'-ACT GCT GTC CCA CAG GAA AC-3'	59,4

##### eIF-4α

eIF-4a_F	5'-CAC CTG GAC GTG TGT TTG AC-3'	59,4
eIF-4a_R	5'-CTG GAT CTT TGG TGG AAG GAG-3'	59,8

##### β-TUB

TUB_F	5'-GAG TTC ACC GAG GCA GAG-3'	58,2
TUB_R	5'-AAA CCC TGC CCT AGA ACC AC-3'	59,4

##### GAPDH

GAPDH_F	5'-CTGCAACTCAGAAGACCGTTG-3'	59,8
GAPDH_R	5'-GAACACGGAAAGCCATACCAG-3'	59,8

##### eIF-1α

eIF-1a_F	5'-CCT TGC TTG AGG CTC TTG AC-3'	59,4
eIF-1a_R	5'-ACC ACC ATA CCA GGC TTG AG-3'	59,4

##### UBC

UBC_F	5'-GTT AAC TCC AGG GTG CAA AAG G-3'	60,3
UBC_R	5'-TCA CTC CAG GGC ATA CAT CC-3'	59,4

Tabelle 2.4c Auflistung der in der Arbeit verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub> [°C]
<i>Primer zur Identifizierung von Referenzgenen für die Real-time PCR</i>		
<b>ACT 1-1</b>		
ACT1-1_F	5'-GAG GTC CTC TTC CAG CCT TC-3'	61,4
ACT1-1_R	5'-CAG CAA TGC CAG GGA ACA TAG-3'	59,8
<b>α-TUB</b>		
TUA_F	5'-TGG AGT GAT GCC TAG TGA CG-3'	59,4
TUA_R	5'-GTT GCC GAT AAG TTC CAG TCC-3'	59,8
<i>Primer für die Real-time PCR</i>		
<b>NgTLP</b>		
tlp_for	5'- GTG GGC AAC AAT TGG ACC CAG -3'	58,8
tlp_rev	5'- CAT TCG ATC CGG AAA GGC TAC -3'	59,8
<b>NrChit1</b>		
chit_for	5'- AAG GGA TCA AGG TCC TCC TAT C -3'	60,3
chit_rev	5'- GAG GTA GTT ATT CCA AAG GTA AGC -3'	59,3
<b>NmAct</b>		
act_for	5'- CTC TTA ACC CCA AAG CAA ACA GG -3'	60,6
act_rev	5'- GTG AGA GAA CAG CCT GGA TG -3'	59,4
<b>Nm18SrRNA</b>		
18SrRNA_for	5'- CTT GAT TCT ATG GGT GGT GGT G -3'	60,3
18SrRNA_R	5'- GTT AGC AGG CTG AGG TCT C -3'	58,8

## 2.2 Molekularbiologie

### 2.2.1 Extraktion von Nukleinsäuren

#### Isolierung genomischer DNA (gDNA)

Um genomische DNA (gDNA) aus *Nepenthes*-Kannen zu extrahieren, wurde die CTAB-(Cetyltrimethylammoniumbromid) Methode (Doyle & Doyle, 1990) gewählt. Hierbei bildet das kationische Detergenz CTAB bei hoher Ionenstärke (>0,7 M NaCl) Komplexe mit Proteinen, jedoch nicht mit Nukleinsäuren und Polysacchariden. Die Proteine werden dabei präzipitiert und die Nukleinsäuren bleiben in Lösung (Sambrook & Russell, 2001).

*Nepenthes*-Kannen wurden mit Mörser und Pistill in flüssigen Stickstoff zu einem Pulver zerkleinert und zu gleichen Volumenanteilen mit 2x CTAB-Extraktionspuffer (2 g CTAB; 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0; 4 ml 0,5 M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); 8,18 g NaCl; 1 g PVP-40 (Polyvinylpyrrolidon M<sub>r</sub> 40000) auf 100 ml) versetzt, 5 min bei 65 °C inkubiert und danach zentrifugiert um restliche, unlösliche Bestandteile zu entfernen. Zur Lösung wurde eine Chloroform/Phenol-Lösung (Verhältnis 1:1) gegeben, um Proteine und Polysaccharide zu entfernen. Diese fallen aus und sammeln sich nach der Zentrifugation (4 °C, 8700 x g, 10 min) in der Interphase. Die Nukleinsäuren befinden sich in der wässrigen Phase, welche abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Um das Phenol vollständig zu entfernen und

sicher zu stellen, dass die Lösung keine Verunreinigungen z.B. durch Proteine enthält, wurde der Vorgang mit Chloroform wiederholt. Die in der Flüssigkeit enthaltene gDNA wurde mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol bei 4 °C für mindestens 1 h bzw. über Nacht gefällt. Danach wurde diese durch Zentrifugation (4 °C, 8700 x g, 10 min) sedimentiert und das Pellet in 400 µl TE-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) aufgenommen. Die Fällung der gDNA erfolgte durch den Zusatz von 200 µl 7,5 M Ammoniumacetatlösung und 1,2 ml Ethanol (EtOH) für 60 min bei -20 °C. Die gDNA wurde durch Zentrifugation (4 °C, 13000 x g, 15 min) sedimentiert. Nach zwei Waschschritten mit 0,5 ml 70 %-igem EtOH wurde das Pellet unter Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Die Quantifizierung der gDNA erfolgte photometrisch in einem Eppendorf® BioPhotometer®, wobei die Reinheit der Präparation anhand der Verhältnisse  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  und  $OD_{260nm}/OD_{230nm}$  bestimmt wurden. Reine DNA liegt bei einem  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$ -Wert von 1,8 vor. Werte oberhalb weisen auf Verunreinigungen durch RNA und Werte unterhalb auf Protein- oder Lösungsmittelverunreinigungen hin. Das Verhältnis  $OD_{260nm}/OD_{230nm}$  sollte zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Höhere Werte zeigen eine Kontamination mit Substanzen an, die bei 230 nm absorbiert werden, z.B. EDTA oder Phenol, während kleinere Werte auf Verunreinigungen mit organischen Substanzen und Kohlenhydraten hinweisen. Die gDNA-Konzentration wurde auf 0,5 µg/µl eingestellt und die Probe bei -20 °C gelagert.

#### Isolierung von Gesamt- und messenger RNA (mRNA)

Falls benötigt, wurden vorab Mörser und Pistill für 10 min mit einer 0,5 M NaOH-Lösung behandelt, mit 0,1 %-igem DEPC- (Diethylpyrocarbonat) Wasser (H<sub>2</sub>O) gespült und autoklaviert. Alle anderen, für die RNA-Extraktion verwendeten Geräte, wurden mit RNase-Zap® (Sigma-Aldrich) behandelt. Puffer und Reagenzien wurden mit DEPC-Wasser hergestellt. Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt und die Proben bei -80 °C gelagert.

#### RNA-Isolierung aus Nepenthes-Kannen

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus *Nepenthes*-Kannen wurde der untere, die Drüsen beinhaltende Teil (etwa zwei Drittel der Kanne), verwendet. Dieser wurde mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zerstoßen, danach mit Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) zu einer sämigen Masse vermischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Über Zentrifugation (4 °C, 2600 x g, 5 min) wurden die festen Bestandteile abgetrennt und der lösliche Teil in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 2 ml 5 M NaCl-Lösung und 6 ml Chloroform pro 10 ml Überstand gegeben, gemischt, zentrifugiert (4 °C, 2600 x g, 30 min) und die obere Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, abgenommen. Dieser Schritt wurde zwei- bis dreimal wiederholt, wobei die Zentrifugationszeit auf 10 min herabgesetzt wurde. Die Fällung der RNA erfolgte durch die Zugabe von einem Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur (RT) für 10 min. Danach wurde die RNA über Zentrifugation (4 °C, 2600 x g, 30 min) sedimentiert und das Pellet zweimal mit 75 %-igem EtOH gewaschen. Anschließend wurde die RNA in 100 µl Nuklease-freien H<sub>2</sub>O (VWR, Darmstadt) resuspendiert. Sollte die RNA für *Real-time* PCR verwendet werden, wurde diese über den QIAGEN RNeasy® Plant RNA Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

Gleichzeitig konnte die gDNA auf der Säule mit 4 Units (U) TURBO™ *DNase* (Invitrogen) für 1 h bei 37 °C verdaut werden.

#### *RNA-Isolierung aus kleinen Gewebemengen*

Das Gewebe wurde in 9 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O und 1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl) in einem PCR-Gefäß gesammelt und für 10 min bei 75 °C lysiert.

Die RNA-Isolierung erfolgte auf zwei Wegen. Zum einen wurde mit dem Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Invitrogen, Darmstadt) mRNA extrahiert. In diesem Kit werden magnetische Dynabeads® mit einem Oligo(dT)<sub>25</sub>-Überhang genutzt um eukaryotische mRNA über deren Poly(A)-Schwanz zu binden. Dafür wurden dem Ansatz 90 µl *Lysis/Binding Buffer* zugesetzt und dieser erneut für 10 min bei 75 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl der Dynabeads® zugesetzt und der Ansatz vorsichtig bei RT für 5 min gemischt. Danach wurde die Reaktion nach Herstellerprotokoll gewaschen, die Dynabeads™ mit der gebundenen mRNA in 10 mM Tris-HCl-Puffer resuspendiert und die Probe mit 2 U TURBO™ *DNase* für 1 h bei 37 °C behandelt. Die *DNase*-Lösung konnte über einen Magneten entfernt, die Dynabeads® in 20 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer resuspendiert und die Probe bei -80 °C bis zur reversen Transkription (RT-PCR) gelagert werden. Der Vorteil dieses Kits liegt, neben der direkten Isolierung von mRNA, außerdem in der Möglichkeit des Umschreibens der mRNA in *copy* DNA (cDNA) direkt an den Dynabeads® über deren Oligo(dT)<sub>25</sub>-Überhang, der als Oligo(dT)-Primer fungiert. Zusätzlich können nachfolgende PCR-Reaktionen ebenfalls an den Dynabeads® vollzogen werden, was z.T. nötig war um einen vollständigen Verdau der gDNA zu garantieren.

Zum anderen erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA mit dem RNeasy®-Micro Kit (Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt). Hier wurde der Ansatz mit *Lysis Solution* auf 100 µl gebracht und das Gewebe nochmals bei 75 °C für 10 min inkubiert. Die Probe wurde dann auf eine Säule gegeben, nach Herstellerprotokoll gewaschen und die RNA zweimal mit jeweils 10 µl *Elution Solution* eluiert. Danach wurde die gDNA mit 2 U TURBO™ *DNase* für 1 h bei 37 °C verdaut und die Reaktion mit 2,5 µl *DNase Inactivation Reagent* gestoppt. Diese konnte dann durch Zentrifugation entfernt werden.

#### **Reverse Transkription**

Die gewonnene RNA wurde über eine RT-PCR in cDNA mit dem SuperScript™ CellsDirect cDNA Synthesis System (Invitrogen) übersetzt. Dazu wurden 1 µl RNaseOUT™, 1 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 µl Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer (100 pmol/µl) bzw. 1 µl Random Hexamers (0,4 µg/µl, QIAGEN) zu 1 µg Gesamt-RNA gegeben, mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O auf 14 µl aufgefüllt und 5 min bei 65 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl SuperScript™ III (200 U/µl) und 4 µl 5x RT-Puffer. Der Ansatz wurde 55 min bei 50 °C inkubiert und für 10 min bei 70 °C deaktiviert. Bei Nutzung der Dynabeads® wurde kein Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer zugefügt, da die Dynabeads™ als dieser fungieren. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

## Plasmid-Präparation

Um Plasmide aus *E. coli* (*Escherichia coli*) zu isolieren, wurde zuerst eine ÜN- (über Nacht) Kultur in 5 ml LB- (Luria Bertani) Medium (5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl, pH 7.0) angesetzt. Wies das Plasmid Resistenzen auf (siehe Tabelle 2.1), so wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37 °C und 220 rpm. Die *E. coli*-Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und die Plasmide mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific/Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der Plasmide wurde photometrisch bestimmt und die Probe bei -20 °C gelagert. Sollte das Plasmid sequenziert werden, so wurden 50 bis 100 ng/μl dessen in einem Gesamtvolumen von 15 μl zu Eurofins MWG Operon GmbH geschickt und dort mit einem Plasmid-spezifischen Primer sequenziert.

### 2.2.2 PCR (*polymerase chain reaction*)

Zur Vervielfältigung der DNA in PCR- (*polymerase chain reaction*) Reaktionen wurden verschiedene Templates (pflanzliches Gewebe, Bakterien, Plasmide, gDNA, cDNA) genutzt. In Tabelle 2.4 ist ein allgemeines PCR-Programm dargestellt, wie es in dieser Arbeit angewendet wurde. Dabei variiert die Zeit des ersten Denaturierungsschritts mit der Art des verwendeten Templates. Die *Annealing*-Temperatur wird von den Schmelztemperaturen der beiden Primer bestimmt (Tabelle 2.2a & b). Die Syntheszeit (Schritt 4) richtet sich nach der Länge des Produkts und der Effizienz der Polymerase. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Taq*- (1 U/μl) und die *Pfu*-DNA-Polymerase (2,5 U/μl) von Fermentas genutzt. Die Reaktionen fanden in einem Eppendorf® Mastercycler® gradient statt.

**Tabelle 2.4 Allgemeines PCR-Programm.**

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	erste Denaturierung	95 °C	30 s bis 3 min
2	Denaturierung	95 °C	30 s
3	Primer-Annealing	55 bis 61 °C	30 s
4	Elongation (Synthese)	72 °C	30 s bis 1,5 min
5	Finale Elongation	72 °C	10 min
6	Aufbewahrung	4 °C	∞

### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Auftrennen von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Gele verwendet. Die Konzentration der Agarose betrug meist 1,5 % (w/v). Nur PCR-Produkte einer Größe von 100 bis 200 bp wurden in 3 %-igen Gelen separiert. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris; 1 mM EDTA; 20 mM Essigsäure, pH 8,5) unter Hitzeeinwirkung gelöst und mit 1 μl einer Ethidiumbromid-Lösung (10 μg/μl) zur späteren Visualisierung versetzt. Diese erfolgte auf der



Geldokumentationsstation BioDocAnalyse (Analytik Jena/Biometra, Jena). Um die Größe der zu trennenden DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde ein Marker mitgeführt. Falls nötig wurden DNA-Fragmente mit dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerprotokoll extrahiert.

#### 2.2.4 Klonierung

Um die Richtigkeit der Sequenz des amplifizierten PCR-Produktes zu überprüfen, wurde dieses in den Vektor pCR®-Blunt II-TOPO® kloniert. Dieser liegt linearisiert vor und erlaubt, durch die an den 3'-Enden gebundene Topoisomerase I, eine *One-Step*-Klonierung von PCR-Produkten mit glatten Enden, wie sie die *Pfu*-DNA-Polymerase produziert. Durch die Insertion des PCR-Produkts wird das Plasmid geschlossen und kann direkt in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert werden. Zur Insertion eines DNA-Fragments in einen Expressionsvektor wird die *multi cloning site* des Plasmids, welche mehrere Restriktionsschnittstellen besitzt, genutzt. Dabei werden die entsprechenden Restriktionsseiten, über die Primer in einer PCR-Reaktion an die Sequenz angehängt. Dafür wurden, wenn möglich, die Schnittstellen von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verwendet. Anschließend wurde das PCR-Produkt direkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut oder, um eine besser Ausbeute zu erlangen, vorher in pCR®-Blunt II-TOPO® kloniert. Nach der Transformation in *E. coli* wurde das Plasmid präpariert und Insert und Vektor mit den Restriktionsenzymen geschnitten. Wurde nur eine Restriktionsschnittstelle verwendet, so musste das geschnittene Plasmid dephosphoryliert werden. Dazu wurden zum Verdau 1 µl (1 U) SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) und 5 µl 10x SAP-Puffer (Fermentas) gegeben, ÜN bei 37 °C inkubiert und das Enzym bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Für die Ligationsreaktion wurden Vektor und Insert (Verhältnis 1:3) mit 1 µl T4 DNA Ligase und 2 µl 10x T4 DNA Ligase-Puffer (New England BioLabs (NEB), Frankfurt am Main) ÜN bei 16 °C inkubiert. Die Reaktion wurde für 10 min bei 65 °C inaktiviert und anschließend in *E. coli* transformiert.

#### 2.2.5 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Es wurden 1 ml einer *E. coli*-ÜN-Kultur in 100 ml LB-Medium überimpft und die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und anschließend durch Zentrifugation (4 °C, 4000 x g, 10 min) geerntet. Danach wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 30 ml TFB-1-Puffer (100 mM RbCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % Glycerol, pH 5,8) resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 4000 x g, 10 min) pelletiert und in 4 ml TFB-2-Puffer (10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % Glycerol, pH 6,8) aufgenommen. Nach dem Aliquotieren (jeweils 100 µl) in sterile Eppendorf-Gefäße wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.6 Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

Von den kompetenten Zellen wurden 100 µl zu einem Ligationsansatz gegeben. Wurden One Shot® TOP10 *E. coli*-Zellen (Invitrogen) benutzt, so wurde ein halbes Aliquot (25 µl) verwendet. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen für 60 s bei 42 °C Hitze-geschockt wurden. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl LB-Medium und die Proben wurden bei 37 °C und 220 rpm für 1 h inkubiert. Die gesamte Probe wurde auf einer LB-Platte ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien konnten in einer Kolonie-PCR mit Vektor-spezifischen Primern oder, nach einer Plasmid-Präparation, durch einen Restriktionsverdau auf das Insert überprüft werden. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.2a dargestellt. Dabei konnten M13 rev (-29) und T7 für pCR®-blunt II TOPO®, pHIS-8-3, pET-28b und -29b, und pQE for und pQE rev für die Plasmide pQE-30, -16 und -70 verwendet werden. Anschließend erfolgte eine Sequenzierung des Plasmidkonstrukts bei Eurofins MWG Operon GmbH. Dabei wurden ebenfalls die oben genannten, Vektor-spezifischen Primer verwendet.

### 2.2.7 Transkript-Analysen

Zur Analyse des Transkriptionslevel kamen zwei Methoden, die *Real-time* PCR und das AFLP- (*amplified fragment length polymorphism*) *fingerprinting*, zur Anwendung. Dabei wurde die Transkription zwischen verschiedenem Kannengewebe, zwischen Kannen zweier *Nepenthes*-Arten (*N. alata* & *N. mirabilis*), sowie zwischen geschlossenen, offenen und gefütterten *N. mirabilis*-Kannen verglichen. Hierfür wurden die Kannen sofort nach Öffnung in einen Feinstrumpf gehüllt, teilweise mit 30 Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) gefüttert und nach sieben Tagen Verdauungszeit geerntet.

#### *Real-time* PCR

Für die *Real-time* PCR wurde die Gesamt-RNA extrahiert und revers transkribiert (Abschnitt 2.2.1). Die PCR-Reaktionen fanden in einem Mx3000P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) statt, wobei 25 µl-Ansätze, bestehend aus 12,5 µl 2x Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene), cDNA (20 bis 75 ng), 400 nM der beiden Primer und 30 nM des passiven Referenzfarbstoffs ROX, verwendet wurden. Die Überprüfung der PCR-Bedingungen erfolgte für jede Probe über eine *non-RT-template*-Kontrolle, um eine Kontamination mit gDNA anzuzeigen. Weiterhin wurde für jedes verwendete Primerpaar eine *non-template*-Kontrolle angefertigt. Damit wird die Qualität der Primer überprüft. Beispielsweise verfälscht die Bildung von Primer-Dimeren die Ergebnisse, da SYBR® Green in diese interkaliert. Die Reaktion wurde mit der Aktivierung der Polymerase für 10 min bei 95 °C gestartet und der Verlauf der PCR über den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green detektiert. Dieser interkaliert in doppel- (*double strand*, ds) nicht aber in einzelsträngiger (*single strand*, ss) DNA. Somit erfolgt die Detektion während des *Annealing*-Schritts, wenn die Oligonukleotide an die DNA binden, oder bei der Synthese des Doppelstrangs. Die Fluoreszenz nimmt im linearen Bereich der Amplifikationskurve proportional mit der Menge des PCR-Produkts zu. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 2.5 dargestellt.

Jeder PCR-Reaktion folgte eine Dissoziationskurve (95 °C 60 s, 55 °C 30 s, 95 °C 30 s), da SYBR® Green sequenzunabhängig an ds DNA bindet und so z.B. die Bildung von Primer-Dimeren durch das Auftreten von mehr als einem Peak detektiert werden kann.

**Tabelle 2.5 Real-time PCR-Programm.**

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Polymerase-Aktivierung	95 °C	10 min
2	Denaturierung	95 °C	30 s
3	Primer-Annealing	61 °C	60 s
4	Elongation (Synthese)	72 °C	60 s

} 40x

Die Effizienz jeder PCR-Reaktion wurde mit der Methode von Liu und Saint (2002) berechnet. Diese kann aus dem linearen Bereich der Amplifikationskurve abgeleitet werden, indem man die relative Amplikonmenge ( $R_n$ ) eines Zykluspunktes (CP) mit der eines anderen in Verbindung setzt (Gleichung 1), wobei Zeitpunkt A vor B liegt.

$$E = \left( \frac{Rn,A}{Rn,B} \right)^{\frac{1}{CPA-CPB}} - 1 \quad [1]$$

Danach lässt sich das relative Expressionsverhältnis über die unten angegebene Gleichung (2) berechnen. Diese wird auch vom Relative Expression Software Tool (REST® 2009, <http://www.gene-quantification.de/rest.html>, Pfaffl *et al.*, 2002) genutzt, welches in dieser Arbeit Anwendung fand und gleichzeitig für die statistische Auswertung genutzt wurde.

$$R(E) = \frac{R(T)}{R(R)} = \frac{(1+E(T))^{\Delta CP(CP(K)-CP(B))}}{(1+E(R))^{\Delta CP(CP(K)-CP(B))}} \quad [2]$$

Das Expressionsverhältnis  $R(E)$  beinhaltet die Expression eines Zielgens  $R(T)$  im Vergleich zu der eines Referenzgens  $R(R)$  und wird aus den CP- (*crossing point*) Werten einer behandelten Probe  $CP(B)$  und einer Kontrolle  $CP(K)$  berechnet. Dabei wird außerdem die Effizienz der PCR-Reaktionen für das Zielgen  $E(T)$  und das Referenzgen  $E(R)$  berücksichtigt. Das Expressionslevel des Referenzgens sollte dabei in Kontrolle und behandelter Probe konstant sein. Generell ist es besser mehrere Referenzgene zu benutzen, weshalb in dieser Arbeit Actin und 18S rRNA als Referenz gewählt wurden.

### AFLP (*amplified fragment length polymorphism*)

Die AFLP- (*amplified fragment length polymorphism*) Methode wurde ursprünglich zum gDNA *fingerprinting* eingesetzt. Die gDNA wird zuerst mit zwei Restriktionsenzymen verdaut, wobei ein häufig (*frequent cutter*) und ein selten schneidendes (*rarely cutter*) Enzym verwendet wird. Anschließend werden Oligonukleotid-Adapter an die Schnittstellen ligiert, die Restriktionsfragmente selektiv amplifiziert und die PCR-Produkte über ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Vos *et al.*, 1995). Um die Änderung des Expressionsmusters zu untersuchen wurde die Methode in der Abteilung für Entomologie (MPI für Chemische Ökologie) für cDNA etabliert. Dazu wurden 3 µl Gesamt-RNA (40 bis 800 ng) mit jeweils 1 µl 5'-SMART IV™- (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG-3') und 3'-CDS III-Primers (5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N-3'; N<sub>1</sub>: A, G, C; N: A, G, C, T) (Clontech-Takara Bio, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) für 2 min bei 72 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 2 µl 5x Puffer, 1 µl DTT (20 mM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl SuperScript™ III erfolgte die reverse Transkription bei 42 °C für 1 h, wobei der modifizierte Oligo(dT)-Primer (3'-CDS III) am Poly(A)-Schwanz bindet. Der SMART™ IV-Primer fungiert am 5'-Ende der mRNA über die drei dG-Reste als kurzes, verlängertes Template, da die reverse Transkriptase über ihre terminal Transferase-Aktivität zusätzliche Nukleotide (meist dC-Reste) an das 3'-Ende der cDNA hängt. Die ss cDNA beinhaltet dann das komplette 5'-Ende der mRNA mit einer Sequenz, die komplementär zum SMART™ IV-Primer ist und am 3'-Ende die Sequenz des CDS III-Primers. Deshalb können anschließend in einer PCR-Reaktion (95 °C 20 s; 24 Zyklen: 95 °C 15 s, 68 °C 6 min) 2 µl der ss cDNA mit je 2 µl CDS III- und einen 5'-Primer (verkürzter SMART IV™-Primer, 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'), 2 µl 50x Advantage 2 Polymerase-Mix, 10 µl 10x Advantage 2 PCR Puffer, 2 µl 50x dNTP-Mix (Clontech) und 80 µl ddH<sub>2</sub>O in ds cDNA umgewandelt und vermehrt werden. Danach erfolgte der eigentliche Vorgang des AFLPs (Sheck *et al.*, 2006; Groot *et al.*, 2009). Dafür wurden in einem 12,5 µl-Ansatz 200 ng ds cDNA mit 0,2 µl (5 U) *EcoRI* (*rarely cutter*, 5'-G<sup>▼</sup>AATTC-3') und 0,3 µl (3 U) *MseI* (*frequent cutter*, 5'-T<sup>▼</sup>TAA-3') in 1,25 µl 10x NEB Puffer 2 bei 37 °C für 2 h verdaut und die Reaktion für 15 min bei 65 °C gestoppt. An die geschnittene ds cDNA wurden anschließend die Adapter ligiert, wobei dazu die Sequenz der Restriktionsschnittstellen genutzt wurden. Zum kompletten Verdau wurden 2,5 µl T4 DNA Ligase-Puffer, 1 µl (5 pmol) *EcoRI*- (oberer Strang: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3', unterer Strang: 5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3') und 1 µl (50 pmol) *MseI*-Adapter (oberer Strang: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3', unterer Strang: 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'), 0,5 µl T4 DNA Ligase, 0,5 µl 10 mM ATP und 7,5 µl ddH<sub>2</sub>O gegeben und der Ansatz für 2 h bei 16 °C inkubiert, bevor dieser für 15 min bei 65 °C gestoppt wurde. Zu 10 µl der Ligationsreaktion wurden 90 µl TE<sub>0,1</sub>-Puffer (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA, pH 8,0) gegeben und davon 2 µl für die Präamplifikation (20 Zyklen: 94 °C 30 s, 56 °C 60 s, 72 °C 60 s) genutzt und mit 2,8 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl 10x PCR-Puffer, jeweils 1 µl (5 pmol) nicht markierter *Mse*-0- und *Eco*-0 Primer, 1 µl dNTP-Mix (2 mM) und 0,2 µl (1 U) *Taq*-Polymerase versetzt. Die Proben wurden 50-fach mit TE<sub>0,1</sub>-Puffer verdünnt und davon 2 µl selektiv mit 4,15 µl ddH<sub>2</sub>O, 1,1 µl 10x PCR-Puffer, 0,1 µl (6 ng) *MseI*- (CAT<sub>OL58</sub>, Kernsequenz: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3') und 0,25 µl IRDye® 700-markierten *EcoRI*-Primer (AAG<sub>700(OL20/OL14)</sub>, ACC<sub>700(OL216/OL221)</sub>; Kernsequenz: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3') und 0,1 µl (0,5 U) *Taq*-Polymerase amplifiziert (94 °C 10 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min; 23 Zyklen: 94 °C 10 s, 56 °C 30 s, 72 °C 60 s). Dabei beinhalten die Primer eine Kernsequenz und drei weitere, selektive Nukleotide am 3'-Ende. Den Proben wurden 10 µl ddH<sub>2</sub>O und 15 µl Formamid-Ladepuffer (95 % Formamid; 10 mM NaOH; 0,25 % Bromphenolblau)

zugegeben und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Von den AFLP-Fragmenten und einen markierten Standard (LI-COR STR Marker, 50-700 bp) wurden 0,6 bis 0,8 µl in einem 8 %-igen Polyacrylamid-Gel im LI-COR Global IR2 4200LI-I Sequencing System (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) für etwa 3 h aufgetrennt, wobei gleichzeitig die Infrarot-markierten DNA-Fragmente über einen Laser-Scanner bei 700 nm detektiert wurden. Um die Fragmente zu sequenzieren, wurden die Proben nochmals in einem neuen Gel für etwa 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses wurde in einem Odyssey® Infrared Imaging System und der SAGA<sup>MX</sup> Software (LI-COR) gescannt und die Banden anhand des Gelbildes, welches der exakten Größe des Gels entspricht, ausgeschnitten. Die extrahierten Banden wurden in 80 µl TE-Puffer aufgenommen und die Polyacrylamid-Matrix durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen zerstört. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Nach einer erneuten PCR-Reaktion mit den oben genannten, jedoch nicht markierten *Mse*I- und *Eco*RI-Primern, wurden 5 µl der Ansätze in einem 1 %-igen Agarose-Gel auf Einzelbanden überprüft. Anschließend konnten die Fragmente sequenziert werden.

## 2.3 Proteinbiochemie

### 2.3.1 Allgemeine Techniken

#### Quantifizierung der Proteine

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Bradford-Assay (Bradford, 1976). Dazu wurden zu 20 µl Proteinlösung 200 µl Bradford-Reagenz (20 mg Coomassie Brilliantblau G-250; 11,88 ml EtOH; 25 ml *o*-Phosphorsäure; 13,12 ml H<sub>2</sub>O) in eine Mikrotiterplatte (NUNC™, Wiesbaden) pipettiert, 10 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm im SPECTRAmax 250-Photometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) gemessen, wobei die Kalibrierung mit 12,5 bis 250 ng/µl BSA (*bovine serum albumin*) erfolgte. Der Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 bildet hierbei einen Komplex mit den Proteinen, indem dieser unspezifisch an kationische und unpolare, hydrophobe Seitenketten bindet.

#### Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) angewendet, wobei die Separierung in einem Multigel-Elektrophoresesystem (Biometra) stattfand. Die Gele wurden aus Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 29:1 hergestellt. Dieses wurde gebrauchsfertig (Rotiphorese®-Gel 30 NF-Acrylamid/Bis) von der Firma Roth bezogen. Die Polymerisierung wird durch den Radikalstarter *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und dem Katalysator Ammoniumpersulfat (APS) vollzogen. Die Gellösung wird zwischen zwei Glasplatten, die durch einen Abstandshalter (0,75 mm) voneinander getrennt sind, gegossen. Dabei unterscheidet man zwei Schichten. Die obere Schicht (etwa 1,5 cm) stellt das Sammelgel dar, welches die Probentaschen enthält und die Proteine komprimiert, um eine bessere Auflösung zu erhalten. Das Trenngel bildet die untere Schicht, in

der die Proteine separiert werden. Dabei bestimmen pH-Wert und Polyacrylamidkonzentration die Trenneigenschaften. Zusätzlich kann man die Proteine unter denaturierten oder nativen Bedingungen separieren.

Unter denaturierten Bedingungen erfolgte die Auftrennung der Proteine über Lämmli-Gele in einem diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem (Lämmli, 1970). Dabei werden Puffer und Gel SDS (*sodium dodecyl sulfate*) zugefügt. Dieses hat neben der Denaturierung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine, auch die Funktion das es, als anionisches Detergenz, die Eigenladung der Proteine überdeckt und sich beim Erhitzen (10 min, 95 °C) so an Proteine lagert, dass Mizellen konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit (etwa 1,4 g SDS pro 1 g Protein) entstehen. Damit bewegen sich die Proteine im elektrischen Feld Richtung Anode und werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Für alle Versuche wurden 10 %-ige Trenngele verwendet, zu deren Herstellung vorbereitete Stammlösungen herangezogen wurden. Das Trenngel bestand aus 6,6 ml Acrylamid-Lösung, 5 ml Trenngelpuffer (0,8 % SDS; 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 8,4 ml dH<sub>2</sub>O, 10 µl TEMED und 66 µl 10 %-ige APS-Lösung. Das Sammelgel enthielt 1,3 ml Acrylamid-Lösung, 5 ml Sammelgelpuffer (0,4 % SDS; 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8), 3,7 ml dH<sub>2</sub>O, 10 µl TEMED und 60 µl 10 %-ige APS-Lösung. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese in Probenpuffer (0,1 % Bromphenolblau; 5 % SDS; 10 % Glycerin; 0,1 M DTT; 60 mM Tris-HCl, pH 6,8) gekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgt für 15 min bei 80 V und dann für etwa 1 h bei 140 V in Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS).

Native Polyacrylamid-Gele wurden zur Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften von Proteinen verwendet. Dabei behalten die Proteine ihre Eigenladung und werden deshalb nicht nur nach ihrer Größe aufgetrennt. Allerdings bleiben Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine erhalten. Die Zusammensetzung der Gele und Puffer entsprach den oben genannten Lämmli-Gele, wobei unter nativen Bedingungen kein SDS zugefügt wurde. Außerdem wurde die Probe vor der Elektrophorese nicht erhitzt.

### Proteinfärbemethoden

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dH<sub>2</sub>O gespült, 1 h in Coomassie-Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliantblau R-250; 30 % Methanol (MeOH); 10 % Essigsäure) unter Schütteln inkubiert und bis die Banden klar sichtbar waren mit Coomassie-Entfärber (30 % Methanol; 10 % Essigsäure) behandelt.

Bei geringen Proteinmengen wurde die Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) angewandt, welche deutlich sensitiver als die Coomassie-Färbung ist. Dabei wurde das Gel 1 h mit Fixierlösung (12 % Essigsäure; 50 % MeOH) behandelt. Nach drei Waschschritten in dH<sub>2</sub>O erfolgte eine Vorbehandlung mit 0,02 % Natriumthiosulfatlösung. Das Gel wurde dann für 20 min in Silberreagenz (0,075 % Formaldehyd; 0,2 % AgNO<sub>3</sub>) inkubiert, wobei sich Silberionen (Ag<sup>+</sup>) an die funktionellen Gruppen und Peptidbindungen der Proteine anlagern und dort zu Silberkeimen reduziert werden. Nach dreimaligem Waschen in dH<sub>2</sub>O wurden die Gele in Entwicklerlösung (4\*10<sup>-4</sup> % Natriumthiosulfat; 0,05 % Formaldehyd; 6 % Natriumcarbonat) gebracht. Dabei werden die Ag<sup>+</sup>-Ionen zu metallischen Silber reduziert, was sehr viel schneller in der Nähe von Silberkeimen geschieht und es bilden sich bräunlich-schwarze Banden. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Aufbewahrungslösung (4,6 % Glycerol; 12 % Essigsäure; 50 % MeOH) durch eine Änderung des pH-Wertes gestoppt.

### 2.3.2 Heterologe Expression in *E. coli*

#### Proteinexpression

Für die heterologe Expression der Proteine NrChit1 und NgTLP in *E. coli* wurde zunächst eine ÜN-Kultur in 5 ml LB-Medium angesetzt. Diesem wurde je nach Expressionsplasmid (siehe Tabelle 2.1) das entsprechende Antibiotikum (pQE-Vektoren: 100 µg/ml Ampicilin (Am); pET-Vektoren: 50 µg/ml Kanamycin (Km)) zugesetzt. Erfolgte eine Co-Expression von Chaperonen wurden zusätzlich 20 µg/ml Chloramphenicol (Cm) zugegeben. Von der ÜN-Kultur wurden 5 ml in 100 ml mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Medium überimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert. Bei größeren Expressionskulturen wurde entsprechend mehr ÜN-Kultur verwendet. Die Expression des Proteins wurde durch 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) und die der Chaperone mit 10 ng/ml Tetracyclin (pG-KJE8, pG-Tf2) und/oder 4 mg/ml Arabinose (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pTf16) induziert (Tabelle 2.1). Die Expression fand bei 220 rpm und 37 °C für 4 bis 6 h bzw. 16 °C ÜN statt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (4 °C, 5000 x g, 20 min) geerntet und bis zur Proteinaufreinigung bei -20 °C gelagert.

#### Proteinaufreinigung

Um das exprimierte Protein aus den Zellen zu extrahieren, wurden diese durch Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen. Die Arbeitsschritte wurden dabei, wie im Handbuch 'The QIAexpression™' (QIAGEN) beschrieben, befolgt. Auch die Pufferlösungen wurden nach diesem Protokoll angefertigt, mit einer geringen Abwandlung des Elutionspuffers (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol, pH 8,0).

Die heterolog exprimierten Proteine besitzen eine Struktur zur Aufreinigung am C- oder N-Terminus, die 6 bis 8 Histidin-Reste beinhaltet. Dadurch können die Proteine über eine mit Ni-NTA- (Nickel-Nitrilotriacetat) Agarose beladene Säule aufgereinigt werden. Diese interagiert über zwei der Histidin-Reste mit dem Nickelion (Ni<sup>2+</sup>). Um Kontaminationen mit *E. coli*-Proteinen zu vermeiden, die ebenfalls über basische AS an das Ni<sup>2+</sup>-Ion binden können, wird mit Imidazol in steigender Konzentration (bis 20 mM) gewaschen und schließlich mit hoher Imidazolkonzentration (250 mM) das heterolog exprimierte Protein von der Säule eluiert. Das Imidazol konkurriert mit dem Histidin-Rest um die Bindung der Ni<sup>2+</sup>-Ionen. Nach der Aufreinigung wurde das Protein bei 4 °C gelagert.

### 2.3.3 Charakterisierung der Proteine

#### Agardiffusionstest

Für den Agardiffusionstest wurde autoklavierter SFM- (*soja flour mannitol*) Agar (20 g/l Sojamehl, 20 g/l Mannitol, 15 g/l Agar) in verschieden große, sterile Petrischalen gegeben. Dabei wurden auch Versuche mit einer definierten Menge Agar pro Petrischale (Ø 90 mm: 25 ml, Ø 55 mm: 12 ml) durchgeführt. Die in Tabelle 2.3a aufgelisteten Pilzstämme wurden vorher auf SFM-Platten

kultiviert. Von diesen wurde Material entnommen, in sterilen dH<sub>2</sub>O bis zu einer OD<sub>600</sub> von mindestens 1 im Ultraschallbad gelöst und gleichmäßig auf die Platten gegeben. Danach wurde ein Loch in die kleinen und drei Löcher in die großen Platten gestanzt und 50 µl Negativkontrolle, als welche der Elutionspuffer (Abschnitt 2.3.2) fungierte oder Probelösung (NgTLP in Elutionspuffer, 1 µg/µl) gegeben. Außerdem wurde Negativkontrolle bzw. Probelösung im Verhältnis 1:5 mit einem 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4,0) verdünnt und davon 50 µl jeweils eingesetzt. Die Ansätze wurden für drei Tage bei 28 °C inkubiert und danach das Wachstum und eine evtl. Hemmhofbildung täglich für die nächsten zwei Wochen beobachtet und photographisch dokumentiert.

Alternativ wurden 500 µl der oben genannten Pilzlösung mit sterilen, 55 °C-warmen ME- (*malt extract broth*; 17 g/l Malzextrakt, 3 g/l Pepton, 15 g/l Agar) oder YM- (*yeast medium*; 3 g/l Hefeextrakt, 3 g/l Malzextrakt; 5 g/l Pepton, 10 g/l Glukose; 15 g/l Agar) Agar auf 12,5 ml in sterilen 15 ml-Falcon-Gefäße aufgefüllt und in eine Petrischale (Ø 55 mm) gegeben. Hatte sich der Agar verfestigt, konnte ein Loch gestanzt und die Negativkontrolle bzw. Probe zugegeben werden. Kultivierung und Dokumentation erfolgte wie oben beschrieben.

### Wachstumskurven

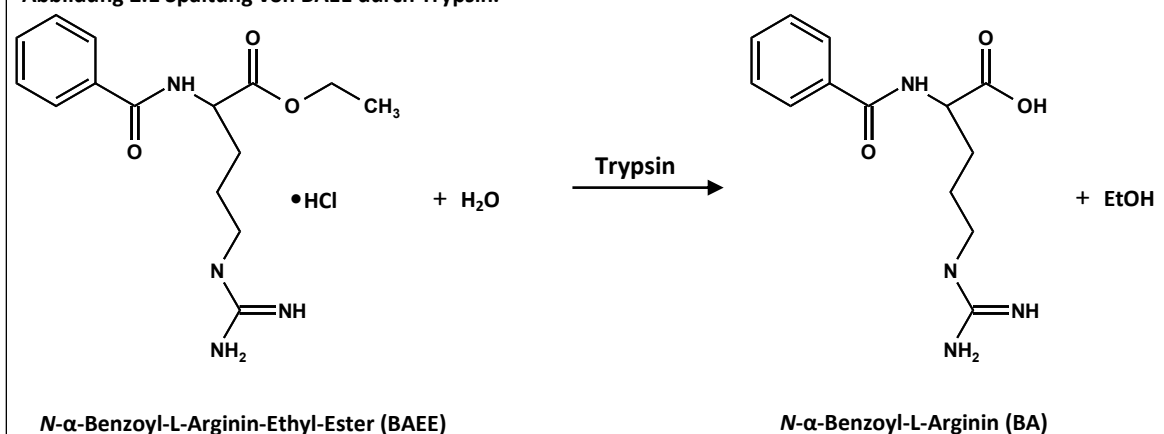
Um eine antimikrobielle Wirkung des NgTLPs zu überprüfen, wurde dessen Aktivität gegen Hefe (*Saccharomyces cerevisiae* & *Schizosaccharomyces pombe*) und das Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Wachstumskurven getestet. Dazu wurden ÜN-Kulturen von beiden Stämmen angefertigt. Von diesen wurde jeweils 1 ml in 10 ml LB- (*P. syringae*) und ME- oder YM-Medium (*S. cerevisiae*, *S. pombe*) überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Es wurden 10 bis 50 µl Elutionspuffer oder Proteinlösung (NgTLP, 1 µg/µl) in eine sterile Mikrotiterplatte pipettiert und der Ansatz mit der beimpften Kultur auf 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurde das Wachstum der Kulturen über die OD<sub>600</sub> bei 30 °C ÜN (ca. 20 h) im SPECTRAMax 250-Photometer gegen einen Leerwert (Elutionspuffer und Medium) gemessen und stündlich dokumentiert.

### Trypsin-Inhibitor-Test

Trypsin hydrolysiert *N*-α-Benzoyl-L-Arginin-Ethyl-Ester (BAEE) zu *N*-α-Benzoyl-L-Arginin und EtOH (Abb. 2.1) bei 25 °C, wobei die Reaktion bei 253 nm photometrisch verfolgt werden kann. Die Unterschiede in den Spektren sind dabei ein Ergebnis der Änderung der Resonanz des gesamten Moleküls aufgrund des Ladungswechsels an der Carboxyl-Position (Schwert & Takenaka, 1955). Diese Reaktion kann durch Trypsin-Inhibitoren unterbunden werden. Der Test wurde nach dem Protokoll des *Enzymatic Assay of Trypsin Inhibitor Test* (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Dazu wurden 25 µl Trypsin (1 µg/µl) mit je 25 µl 1 mM HCl und Trypsin-Inhibitor (1 µg/µl) bzw. NgTLP (1 µg/µl) versetzt und mit einer 1 mM HCl-Lösung auf 500 µl gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden jeweils 10 µl der Vorprobe in eine Mikrotiterplatte pipettiert, 150 µl der BAEE-Substratlösung (0,25 mM) zugegeben und die Absorption bei 253 nm und 25 °C alle 15 s über mindestens 30 min dokumentiert.



Abbildung 2.1 Spaltung von BAEE durch Trypsin.



### Überprüfung hydrolytischer Eigenschaften

Um die hydrolytische Aktivität von NrChit1 und NgTLP zu bestimmen, wurden Kohlenhydrat-Substrate eingesetzt und deren Spaltung visuell oder photometrisch beobachtet.

#### Glucanase-Test

Zur photometrischen Überprüfung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucanase-Aktivität wurden zwei mit *p*-Nitrophenyl-markierte Substrate, ein  $\alpha$ - und ein  $\beta$ -D-Glucopyranosid, verwendet. Die Aktivität des Enzyms kann über die Freisetzung von *p*-Nitrophenol bei 410 nm anhand einer Standardkurve verschiedener Konzentrationen ( $10^{-5}$  bis  $10^{-4}$  M) von *p*-Nitrophenol gemessen werden. Dabei wurden 25  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer (Abschnitt 2.3.2), Positivkontrolle (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\alpha$ -Glucosidase (*Saccharomyces cerevisiae*) bzw.  $\beta$ -Glucanase (*Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich) oder NgTLP (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mit 75  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Substrats (5 mM) versetzt und die Absorption bei 410 nm und 37 °C für 1 h alle 5 min dokumentiert.

#### Chitinase-Test

Chinolytische Aktivität wurde fluorometrisch mit dem Chitinase Assay Kit (Sigma-Aldrich) getestet. Dieser enthält drei verschiedene Substrate. Das Dimer 4-Methylumbelliferyl- (4MU) *N*-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminid [(GlcNAc)<sub>1</sub>] dient dem Nachweis einer Exochitinase, das Trimer 4MU-*N,N'*-Diacetyl- $\beta$ -D-chitobiosid [4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>] als Substrat für eine Chitobiosidase sowie einer Exochitinase und mit dem Tetramer 4MU- $\beta$ -D-*N,N',N''*-Triacetylchitotriose [4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub>] ist es möglich Endochitinase-Aktivität zu detektieren. Die chinolytische Aktivität wurde über die Spaltung der  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindung und des dabei freigesetzten 4-Methylumbelliferones in einem Fluorometer (SPECTRAMax Gemini XS Microplate Fluorometer) bei einer Anregungsstrahlung von 360 nm und einer Emission von 450 nm gemessen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Substrate wurden jeweils in einer Konzentration von 0,25 mg/ml eingesetzt. Als Positivkontrolle diente eine Chitinase von *Trichoderma viride* (1 ng/ $\mu\text{l}$ ). Die

Konzentration der Probe (NrChit1) betrug 0,1 µg/µl. Gemessen wurde gegen eine Standardkurve verschiedener 4MU-Konzentrationen (5 bis 100 ng).

Als weiteres Endochitinase-Substrat diente das lösliche, polymere *Carboxymethyl-Chitin-Remazol Brilliant Violet* (CM-Chitin-RBV, LOEWE Biochemica, Sauerland). Die Reaktionsansätze enthielten 50 µl des jeweiligen Puffers, Positivkontrolle (Chitinase von *Streptomyces griseus* (10 µg/µl), Sigma-Aldrich) oder Probe (NrChit1 bzw. Kannenflüssigkeit) und 150 µl CM-Chitin-RBV (2 mg/ml). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 20 µl einer 0,25 M HCl-Lösung und nach einer Inkubationszeit von 5 min bei -20 °C gestoppt. Das unverdaute, polymere Substrat konnte über Zentrifugation bei 4 °C für 5 min präzipitiert werden. Die Absorption des Überstands wurde bei 560 nm photometrisch bestimmt.

#### *Substrat-Platten-Test*

Um die hydrolytische Spaltung von polymeren Kohlenhydraten visuell nachzuweisen, wurden 0,25 % Substrat (Xylan, Carboxymethyl- (CM) Cellulose oder Laminarin) mit einer 1,5 %-igen Agar-Lösung gemischt und in eine Petrischalen (Ø 90 mm) gegeben. Nach Verhärtung des Agars wurden Löcher gestanzt, jeweils 50 µl von Positiv-, Negativkontrolle bzw. Probe in diese pipettiert und 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle setzte sich dabei aus 1 µg/µl BSA und 10 % Glycerol zusammen, wobei der Positivkontrolle 1 µg/µl des jeweiligen Enzymes (Xylanase (*Thermomyces lanuginosus*), Cellulase oder β-Glucanase (*Aspergillus niger*), Sigma-Aldrich) zugefügt wurde. Die Probe wurde im Vorversuch konzentriert in Elutionspuffer eingesetzt. Später wurden 10 µl NgTLP mit 40 µl eines 50 mM Natriumacetat-Puffers (pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5) versetzt. Anschließend erfolgte die Färbung der Platten mit einer 0,1 %-igen Congo Red-Lösung für 30 min bei RT. Diese wurden danach mit einer 1 M NaCl-Lösung wiederum für 30 min bei RT entfärbt, um die Hemmhöfe besser sichtbar zu machen.

## **2.4 Bioinformatik**

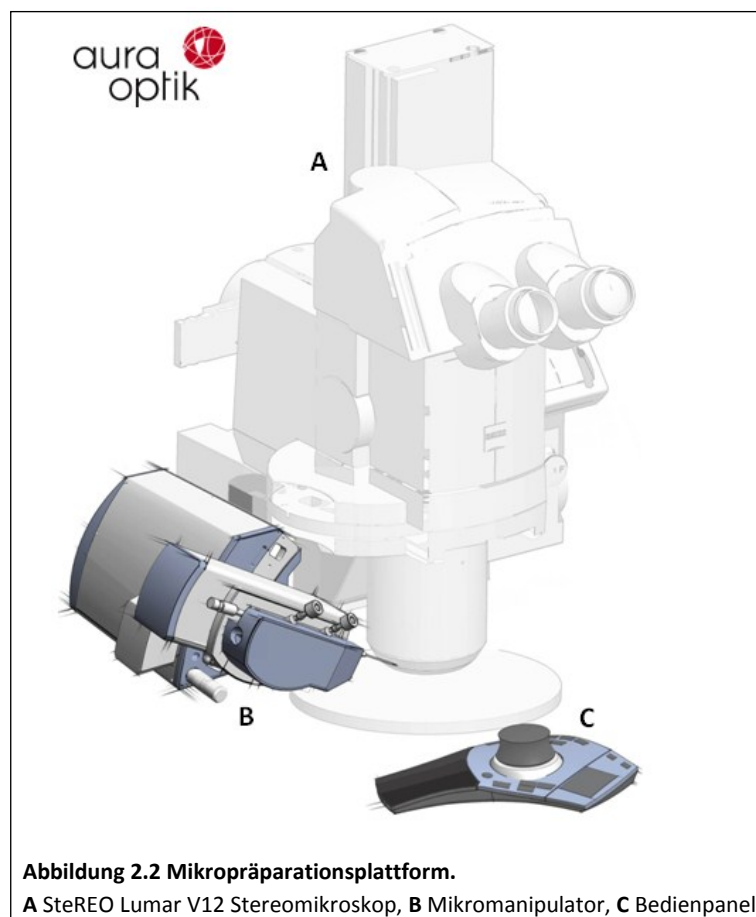
Für die theoretische Untersuchung und Charakterisierung von Protein- und Nukleotidsequenzen wurden verschiedene Programme und Datenbanken verwendet. Um Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen zu bestimmen, wurden diese gegen auf Datenbanken wie NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) hinterlegte Proteine und Nukleotide über die Blast-Funktion getestet. Die Überprüfung bestimmter Strukturmerkmale fand auf NCBI, ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/>) und EBI (*European Bioinformatics Institute*, <http://www.ebi.ac.uk/>) statt. Die Vorhersage von Signalpeptiden (Bendtsen *et al.*, 2004) und post-translationaler Modifikationen erfolgte über den CBS Prediction Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>). Die 3D-Strukturen von NrChit1 und NgTLP konnten über die Web-basierte Anwendung SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) berechnet werden. Dabei wird die 3D-Struktur der eingegeben Proteinsequenz anhand eines homologen Proteins, dessen räumliche Struktur aufgrund von z.B. Röntgenstrukturanalyse bereits bekannt ist, modelliert (Guex & Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006).

Primer wurden meist mit der DNASTAR Lasergene® Software (GATC BIOTECH, Konstanz) entworfen. Nur die Berechnung der Oligonukleotide für die *Real-time* PCR erfolgte mit der Primer3Plus Software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Sequenz-Alignments wurden entweder mit den Web-basierten Programmen ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) und MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), oder mit DNASTAR Lasergene® vollzogen.

Phylogenetische Analysen wurden in der Abteilung Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität in München in der Gruppe von Prof. Dr. Günther Heubl von Florian Turini vorgenommen. Dabei wurde der molekular-phylogenetische Baum nach der Maximum-Parsimony-Methode in der PAUP\* 4.0b10 Software (Swofford, 2003) mit den vorgegebenen Suchkriterien angefertigt. Zusätzlich erfolgte noch eine Bayesische-Analyse mit einem Markov-Chain-Monte-Carlo-Algorithmus über die MrBayes 3.1.2 Software (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Dabei wurde das HKY- (Hasegawa *et al.*, 1985) und für invariable Positionen, HKY+I-Modell angenommen. Dieses wurde als *Best-fit*-Modell für die Evolution von Sequenzen über die Likelihood-Ratio-Tests, die mit der MrModeltest 2.2 Software (Nylander, 2004) durchgeführt wurden, ermittelt. Nach den vorgegebenen Suchkriterien von MrBayes wurden gleichzeitig vier *Markov-Chains* berechnet. Die Analyse wurde nach 1.000.000 Generationen beendet und die Bäume in einem 50 % *Majority rule consensus tree* zusammengefügt.

## 2.4 Mikropräparation



Um Drüsen und epidermales Gewebe aus den *Nepenthes*-Kannen zu isolieren, wurde das System der aura optik GmbH (Jena) getestet. Die Mikropräparationsplattform aureka® setzt sich aus einem Stereomikroskop (SteREO Lumar V12, Zeiss, Jena) und einem Mikromanipulator, der über ein Bedienpanel gesteuert werden kann (aura optik GmbH), zusammen (Abb. 2.2).

An den Mikromanipulator lassen sich verschiedene Instrumente anschließen, z.B. eine Pinzette oder Kapillare, welche man dann mithilfe des Bedienpanels in x-, y-, und z-Richtung bewegen kann. Der Prozess lässt sich über das Mikroskop beobachten und dokumentieren.

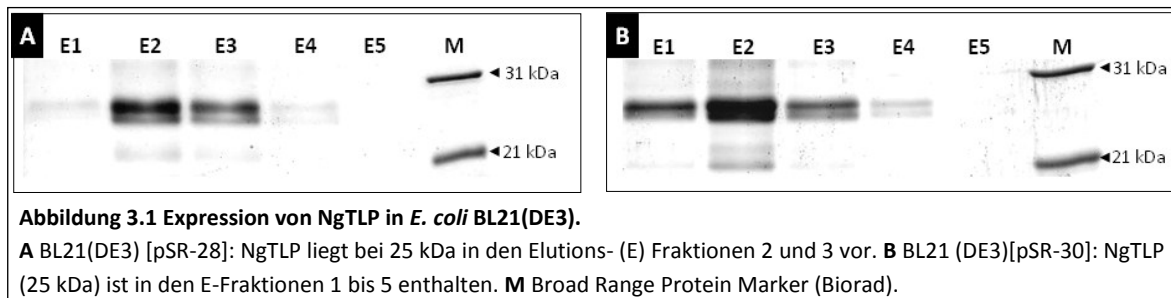
### 3.1 Heterologe Expression der Proteine in *E. coli*

Zwei der in früheren Arbeiten identifizierten Proteine sollten funktionell charakterisiert werden. Deshalb mussten diese zunächst heterolog exprimiert werden. Dazu wurden die Expressionsplasmide und *E. coli*-Stämme genutzt, die in Tabelle 2.2a und 2.3b aufgelistet sind. Die wichtigsten in dieser Arbeit produzierten Plasmide sind im Anhang (Tabelle 6.1) aufgeführt.

#### 3.1.1 Expression des *Thaumatococcus*-like proteins aus *N. gracilis* (NgTLP)

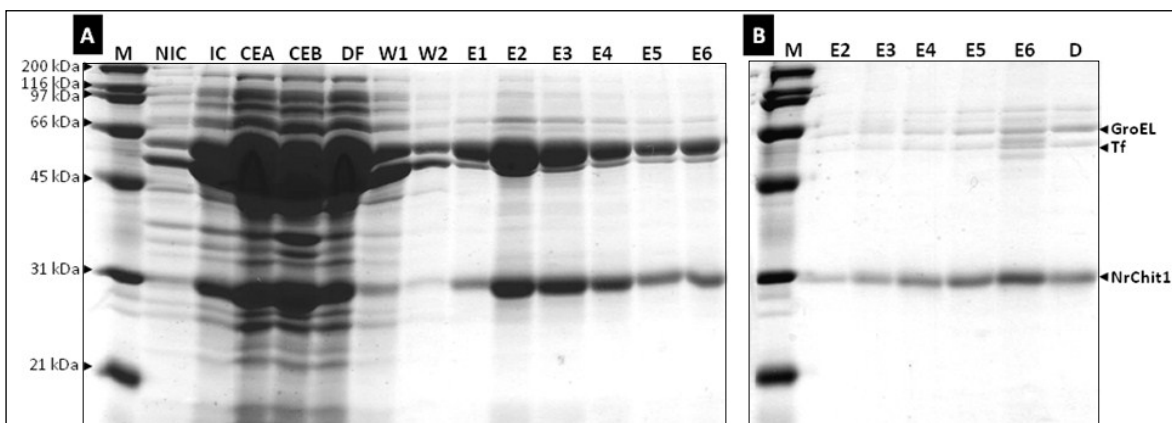
Zunächst wurden über PCR-Reaktionen Restriktionsschnittstellen in die, in pCR®-Blunt II-TOPO® vorliegende, vollständige cDNA-Sequenz (NCBI: DQ352144) von NgTLP (pSR-6), eingebracht. Die dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 2.4b dargestellt. *Sense*- und *Antisense*-Primer konnten dabei untereinander kombiniert werden und die Amplifikation erfolgte mit demselben PCR-Programm (95 °C 3 min; 30 Zyklen: 95 °C 30 s, 59 °C 60 s, 72 °C 60 s; 72 °C 10 min). Die PCR-Produkte wurden anschließend entweder in das Plasmid pCR®-Blunt II-TOPO®, oder mit den entsprechenden Restriktionsenzym(en) verdaut und gleich in den Expressionsvektor kloniert. Zuerst erfolgte die Herstellung der Plasmide pSR-7 & -8 (Tabelle 6.1). Dazu wurde pQE-30 genutzt, ein Vektor mit N-terminalem 6xHis-Tag, über welchen das exprimierte Protein mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden kann. Das Insert von pSR-7 beinhaltet dabei das Signalpeptid (SP) und das von pSR-8 nicht. Die Expression fand in den *E. coli*-Stämmen M15 und SG13009 bei 16 °C und 37 °C statt und ergab in beiden Fällen lösliches Protein (Abb. 6.1), das sich allerdings nicht aufreinigen ließ. Deshalb wurde als nächstes der Vektor pHIS-8-3 mit einem 8x N-terminalen His-Tag gewählt und das Insert aus pSR-8 ausgeschnitten und in pHIS-8-3 kloniert. Allerdings war hier kaum eine Expression des Proteins zu verzeichnen. Der nächste Schritt war verschiedene Varianten des NgTLPs in das Klonierungsplasmid pCR®-Blunt II-TOPO® zu bringen. Dabei wurde auf das Einbringen verschiedener Restriktionsschnittstellen, das Hinzufügen oder Weglassen des Signalpeptids (SP), die Notwendigkeit eines Stop-Codons (SC) und einer evtl. Leseraster-Verschiebung (RV) geachtet. Es entstanden die Plasmide pSR-11 bis -17 (Tabelle 6.1). Dies hat einerseits den Vorteil, dass der Klonierungsvektor in höherer Kopie in *E. coli*-TOP10-Zellen vorliegt und das Insert in hoher Konzentration gewonnen werden kann. Andererseits können so schnell passende Fragmente für das gewünschte Expressionsplasmid aus dem Klonierungsvektor geschnitten werden. Ausgehend von diesen Plasmiden wurde nun die *NgTLP*-Sequenz in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert und versuchsweise in verschiedenen *E. coli*-Stämmen z.T. mit einer Chaperon-Co-Expression bei 16 °C und 37 °C exprimiert. Erstaunlicherweise war nur die Expression von pSR-28 und -30 in *E. coli* BL21(DE3) bei 37 °C erfolgreich. Beides sind pQE-Vektoren, die einen *T5*-Promotor besitzen. *E. coli* BL21(DE3) weist allerdings das *T7*-RNA-Polymerase-Gen ([http://openwetware.org/wiki/E.\\_coli\\_genotypes](http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes)) auf. Beide Plasmide enthalten ein NgTLP-Insert ohne SP, welches mit dem Primerpaar *tlp\_exp\_sense2* und *tlp\_exp\_antis4* (Tabelle 2.2a) generiert und in pQE-70 bzw. pQE-16 kloniert wurde. Die

exprimierten Proteine konnten über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden (Abb. 3.1). Das Protein lag in Elutionspuffer vor und wurde für spätere Experimente bei 4 °C gelagert.



### 3.1.2 Expression der Chitinase aus *N. rafflesiana* (NrChit1)

Auch für NrChit1 wurden zunächst ausgehend von pChit, dem pCR®-Blunt II-TOPO®-Vektor, der die vollständige *NrChit1*-cDNA-Sequenz (NCBI: DQ530442) enthält, Sequenzvarianten (mit/ohne SP bzw. SC) über verschiedene Primer-Kombinationen (Tabelle 2.4b) in PCR-Reaktionen (95 °C 3 min; 30 Zyklen: 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s; 72 °C 10 min) hergestellt und in pCR®-Blunt II-TOPO® kloniert (pRS-1-6, Tabelle 6.1). Anschließend wurden diese Sequenzen aus dem Klonierungsvektor ausgeschnitten und in ein Expressionsplasmid ligiert. *NrChit1*-Fragmente, die über pQE-Vektoren exprimiert werden sollten, wurden in *E. coli* M15 bzw. SG13009 und die über pHIS-8-3 in BL21(DE3)-*E. coli*-Stämme transformiert und versuchsweise bei 37 °C exprimiert. NrChit1 wurde in den Systemen M15[pREP4, pRS-9] gar nicht, in M15[pREP4, pRS-13] nur unlöslich und in BL21(DE3)[pRS-6] in geringer Konzentration löslich exprimiert. Deswegen wurden die fünf Chaperon-kodierenden Plasmide (Tabelle 2.2b) dem System BL21(DE3)[pRS-6] zugesetzt und bei 16 °C und 37 °C exprimiert mit dem Resultat, dass durch die Co-Expression der Plasmide pGtf2 oder pTf16 bei 16 °C die Konzentration an löslichem NrChit1 deutlich anstieg (Abb. 3.2, A).



Das Protein kann über den 8xHis-Tag aufgereinigt werden, wobei allerdings auch die Chaperon-Proteine GroEL/ES und Tf, die über pGTf2 exprimiert werden, in die Elutionsfraktionen gelangen (Abb. 3.2, A). Diese konnten aber über eine Dialyse weitestgehend entfernt werden. Niedermolekulare Substanzen wurden nach der Dialyse über PD-10 Säulen (PD-10 *Desalting Column*, GE Healthcare, Freiburg) beseitigt (Abb. 3.2, B).

Der Vektor pRS-6 enthält das *NrChit1*-Insert ohne SP, das mit den Primern *chit\_exp\_sense2* und *chit\_exp\_antis3* (Tabelle 2.4b) generiert und nach dem Verdau mit *Bam*HI in das Expressionsplasmid pHIS-8-3 kloniert wurde. Anschließend wurde das Konstrukt in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, welche das entsprechende Chaperon-kodierende Plasmid bereits enthielten, transformiert. Das System *E. coli* BL21(DE3)[pGTf2, pRS-6] wurde für spätere Expressionsansätze genutzt und, nach Expression und Aufreinigung, NrChit1 im Elutionspuffer bei 4 °C gelagert.

### 3.2 Proteincharakterisierung

Die in *E. coli* exprimierten Proteine, NgTLP und NrChit1, wurden über bioinformatische Analysen sowie experimentelle Methoden charakterisiert.

#### 3.2.1 *Thaumatococcus*-like protein aus *Nepenthes gracilis* (NgTLP)

##### Proteinstruktur

Das Vorkommen von TLPs im *Nepenthes*-Verdauungsssekret wurde schon mehrfach bestätigt (Hatano & Hamada, 2008; Rottloff *et al.*, 2009). Das hier untersuchte TLP aus *N. gracilis* besteht aus einer Vollängen-cDNA-Sequenz von 678 bp, die in ein aus 225 Aminosäuren (AS) bestehendes Protein transkribiert wird und ein putatives N-terminales 24 AS langes Signalpeptid enthält (Abb. 3.3), das für den Transport aus der Zelle verantwortlich ist. Damit weist das reife Protein eine Länge von 201 AS, ein theoretisches Molekulargewicht von 21 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 3,9 auf.

MSQFIKFIVFPSLLALLSISIDAATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLDPGQWTINVNAGQTGGRVWAR  
TGCSLSGSNGASQSGDCGGLLQCQGYGSPNTLAEYSLNQYNNLDFDMSLVDGFNVPM SFLPTSNGCT  
NGPTCTADINGQCPSCLKAPGGCNNPCTVFKTDEYCCNSGSCSPTSSEFFKNLCPDAYSYPKDDATSTYTCP  
GGTNYKVVFCP

##### Abbildung 3.3 Abgeleitete AS-Sequenz von NgTLP.

NgTLP besteht aus 225 AS, wobei sich am N-Terminus ein 24 AS langes Signalpeptid (grün) befindet. Das reife Protein besitzt 16 konservierte C-Reste (fett), die 8 Disulfidbindungen bilden können. Diese sind wie folgt gekennzeichnet: C<sup>33</sup>/C<sup>224</sup>, C<sup>74</sup>/C<sup>84</sup>, C<sup>89</sup>/C<sup>95</sup>, C<sup>140</sup>/C<sup>213</sup>, C<sup>146</sup>/C<sup>196</sup>, C<sup>154</sup>/C<sup>164</sup>, C<sup>168</sup>/C<sup>177</sup>, C<sup>178</sup>/C<sup>183</sup> und im Taumatococcus\_2-Motiv (PS51367) enthalten. Die Thaumatococcus\_1-Signatur (PS00316, Gx[GF]xCxT[GA]DCx(1,2)[GQ]x(2,3)C) ist nur teilweise enthalten (GASCQSGDCGGLLQC grau unterlegt). Die konservierten, sauren Reste sind ausgehend vom reifen Protein rot (E<sup>83</sup>, D<sup>96</sup>, D<sup>101</sup>, D<sup>182</sup>) und die aromatischen AS blau (Y<sup>74</sup>, Y<sup>89</sup>, F<sup>94</sup>, Y<sup>176</sup>) dargestellt. Diese umgeben die zentralen Spalte.

Das Protein gehört zu den L-Typ TLPs und besitzt 16 konservierte Cystein-Reste, die theoretisch acht Disulfidbindungen (Abb. 3.3; C<sup>33</sup>/C<sup>224</sup>, C<sup>74</sup>/C<sup>84</sup>, C<sup>89</sup>/C<sup>95</sup>, C<sup>140</sup>/C<sup>213</sup>, C<sup>146</sup>/C<sup>196</sup>, C<sup>154</sup>/C<sup>164</sup>, C<sup>168</sup>/C<sup>177</sup>, C<sup>178</sup>/C<sup>183</sup>) bilden können.

Analysen mit Scanprosite (<http://expasy.org/>) ergaben, dass NgTLP nur einen Teil der klassischen Thaumatin-Superfamilien-Signatur (Thaumatin\_1, Prosite-Nr.: PS00316) besitzt, wie es z.B. in Zeamatin (NP\_001105356) enthalten ist, sondern dem Thaumatin\_2-Motiv (Prosite-Nr.: PS51367) entspricht (Abb. 3.3), welches die acht konservierten Disulfidbrücken beinhaltet.

Die 3D-Struktur von NgTLP wurde anhand der Kristallstruktur eines TLPs aus Banane (Ban-TLP, 1Z3Q\_A, Leone *et al.*, 2006), welches ohne Signalpeptid eine Ähnlichkeit von 77 % zu NgTLP (ABC73397) auf Proteinebene aufweist (Abb. 3.4), über die Web-basierte Anwendung SWISS MODEL modelliert.

1Z3Q_A	ATFEIVNRCSYTVWAAAVPGGGRQLNQGSWTINVNAGTTGGRIWGRGTGC	50
ABC73397	ATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLDPGQTWTINVNAGQTGGRVWARTGC	50
	***:***.*.***** ***:**:*:***** ***:*.****	
1Z3Q_A	SFDGSGRGRCQTGDCGGVLSC <sup>T</sup> AYGNPPNTLA <sup>E</sup> FALNQ <sup>F</sup> NNLD <sup>F</sup> DISLV	100
ABC73397	SLSGSNGASCQSGDCGGLLQC <sup>Q</sup> YGSPNTLA <sup>E</sup> YSLNQ <sup>Y</sup> NNLD <sup>F</sup> DM <sup>F</sup> SLV	100
	*:.**.*. ***:*****:*. * .**.******:.*:*****:*****:***	
1Z3Q_A	DGFNVPMDFSP <sup>T</sup> SGGCR-GIRCAADINGQCPGALKAPGGC <sup>N</sup> NPCTVFKTD	149
ABC73397	DGFNVPM <sup>S</sup> FLPT <sup>S</sup> NGCTNGPTCTADINGQCPSELKAPGGC <sup>N</sup> NPCTVFKTD	150
	*****.* ***.** * *:*****. *****	
1Z3Q_A	QYCCNSGACSP <sup>T</sup> DYSQFFKRNCPDA <sup>S</sup> YSPKD <sup>D</sup> QTTTFTCPGGTNYRVVFCP	200
ABC73397	EYCCNSGSCSP <sup>T</sup> SYSEFFK <sup>N</sup> LC <sup>P</sup> DA <sup>S</sup> YSPKD <sup>D</sup> ATSTYT <sup>C</sup> PGGTNYKV <sup>V</sup> FCP	201
	:*****:*****.*:***. ***** *.*:*****:*****	

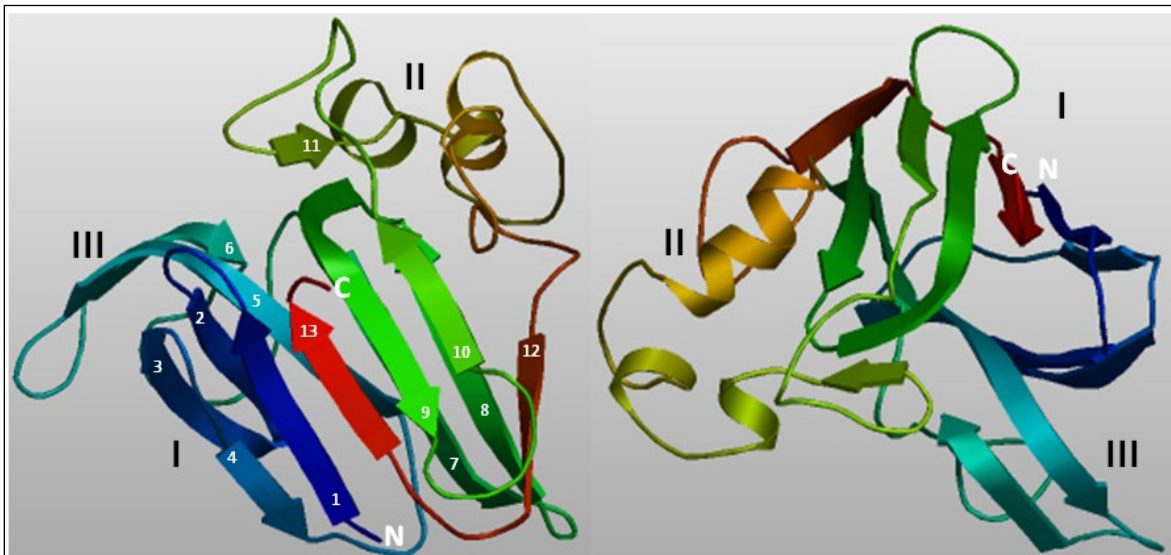
**Abbildung 3.4 Alignment des TLPs aus Banane (1Z3Q\_A) und NgTLP (ABC73397).**

Hier wurde jeweils der aktive Teil der Proteine, d.h. ohne Signalpeptid, miteinander verglichen, welcher einer Ähnlichkeit von 77 % entspricht. Grau unterlegt ist das Thaumatin\_1-Motiv, das nur beim Ban-TLP vollständig auftritt. Die konservierten, sauren Reste, die die zentrale Spalte umgeben, sind rot (NgTLP E<sup>83</sup>, D<sup>96</sup>, D<sup>101</sup>, D<sup>182</sup>; Ban-TLP: E<sup>83</sup>, D<sup>96</sup>, D<sup>101</sup>, D<sup>181</sup>) und die aromatischen AS blau (NgTLP: Y<sup>74</sup>, Y<sup>89</sup>, F<sup>94</sup>, Y<sup>176</sup>; Ban-TLP: Y<sup>74</sup>, F<sup>89</sup>, F<sup>94</sup>, Y<sup>175</sup>) dargestellt.

Nach diesem Modell besteht das Protein aus drei Domänen (I, II, III). Domäne I stellt den kompakten Kern des Moleküls, ein  $\beta$ -Sandwich, dar. Dabei bilden die  $\beta$ -Faltblätter  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_7$ ,  $\beta_8$  und  $\beta_{12}$  zusammen mit einem Teil von  $\beta_5$  die Vorder- und  $\beta_1$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_9$ ,  $\beta_{10}$  und  $\beta_{13}$  die Rückseite des Sandwiches (Abb. 3.5, links). Die Domäne wird von zwei weiteren Domänen (II & III) flankiert, wobei Domäne II aus kleinen Schleifen und einer verlängerten  $\alpha$ -Helix, verbunden mit einem kurzen  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta_{11}$ ), und Domäne III aus einer Haarnadel-Struktur, gebildet von zwei  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta_5$  &  $\beta_6$ ), besteht.

Die Faltung der drei Domänen wird über die 8 konservierten Disulfidbrücken stabilisiert (Abb. 3.3). Die Domänen I und II generieren eine zentrale Spalte, die aufgrund der Ähnlichkeit zum Ban-TLP, höchst wahrscheinlich reich an hydrophilen AS ist, welche von aromatischen Resten (Abb. 3.3; Y<sup>74</sup>, Y<sup>89</sup>, F<sup>94</sup>, Y<sup>176</sup>) umgeben sind.





**Abbildung 3.5 Anhand von Ban-TLP errechnete 3D-Struktur von NgTLP in zwei verschiedenen Ansichten.**

Das Protein besteht aus den drei Domänen I, II und III. Den Kern bildet Domäne I (blau, rot & grün), ein  $\beta$ -Sandwich, an dessen Bildung 11  $\beta$ -Faltblättern beteiligt sind. Domäne II beinhaltet eine  $\alpha$ -Helix, ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt und verschiedene Schleifen und Domäne III (türkis) ist eine Haarnadel, gebildet von zwei  $\beta$ -Faltblättern. ( $\beta$ -Faltblätter sind mit 1-13 nummeriert).

Außerdem kommen in dieser Region, welche einen starken elektronegativen Charakter haben soll, auch saure AS (Abb. 3.3; E<sup>83</sup>, D<sup>96</sup>, D<sup>101</sup>, D<sup>182</sup>) vor (Leone *et al.*, 2006). Die Elektronegativität der zentralen Spalte wurde schon für einige TLPs beschrieben. Durch native PAGE konnte gezeigt werden, dass NgTLP das gleiche Laufverhalten im nativen sowie auch im denaturierten Gel zeigt (Abb. 6.1). Demnach scheint das Protein einen Monomeren Status einzunehmen.

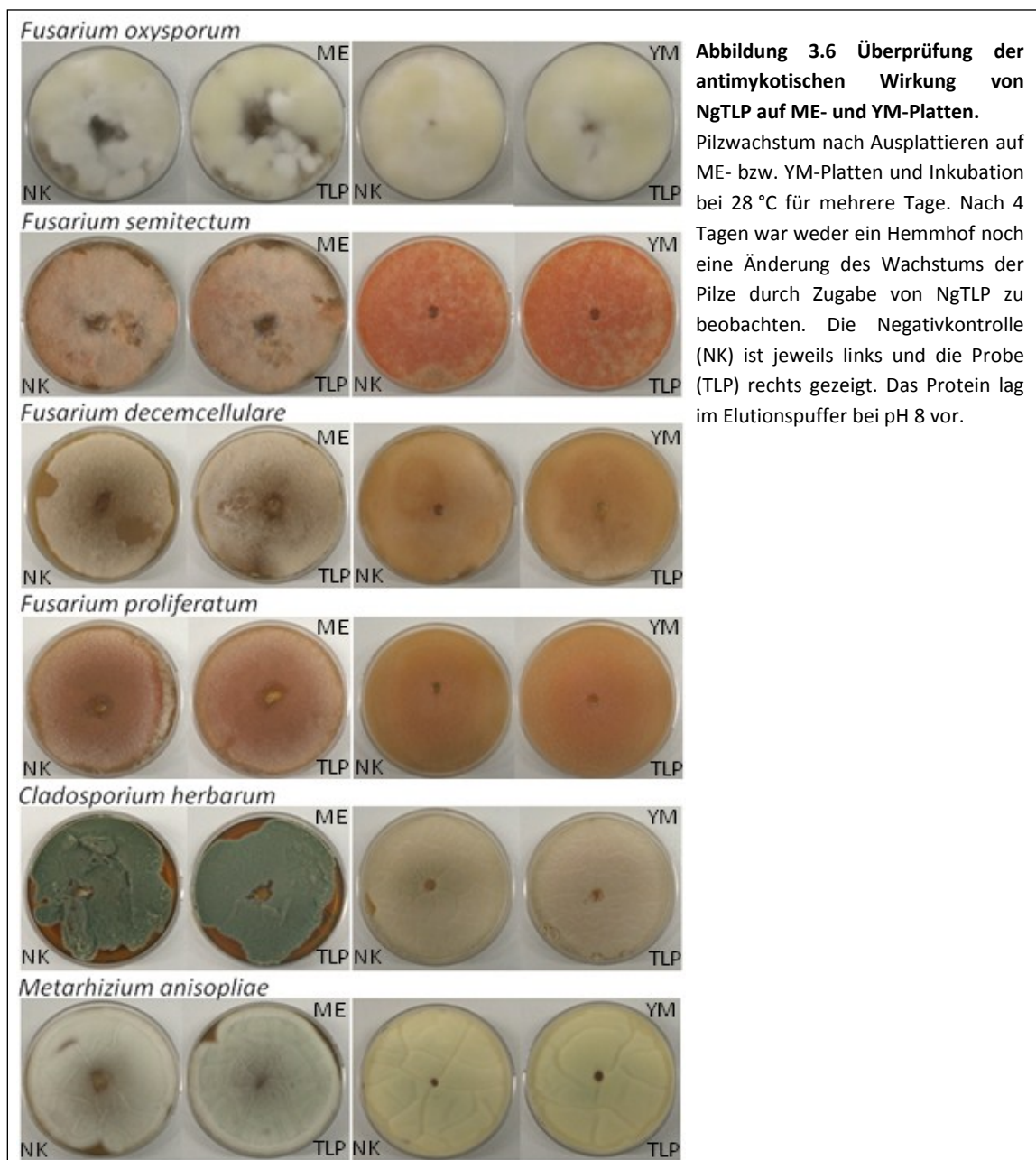
### Untersuchung antimikrobieller Eigenschaften

In der Literatur wurden TLPs mit antimikrobiellen Eigenschaften beschrieben (Vigers *et al.*, 1992; Chu & Ng, 2003). Um zu überprüfen, ob auch NgTLP diese Funktion besitzt, wurden zwei Methoden gewählt. Zum einen der Agardiffusionstest, bei dem eine homogene Lösung des zu testenden Organismus auf eine Agarplatte ausgestrichen wird. Die zu untersuchende Probe wird anschließend in ein Stanzloch auf die Platte gegeben. Wachstumsinhibierende Wirkung zeigt sich dann durch einen Hemmhof rund um das Loch mit der Probe. Zum anderen wird die Aktivität gegen Organismen in Flüssigkultur getestet. Da nur begrenzte Mengen an heterolog exprimiertem Protein produziert werden können, wurde die Wachstumsinhibierung in Mikrotiterplatten mit kleinen Volumina durchgeführt. Die Messung erfolgte im Plattenphotometer mit regelbarer Temperatur.

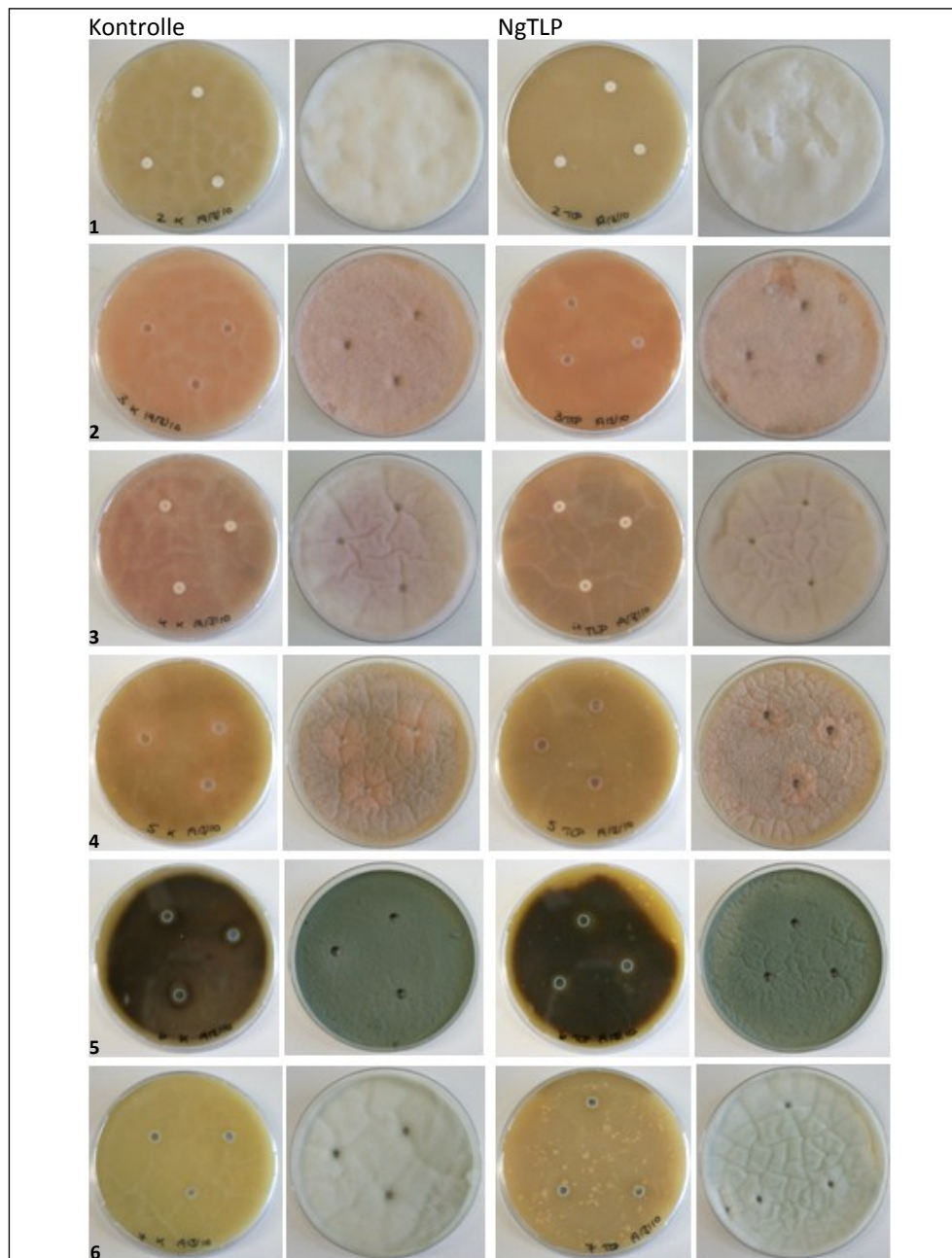
In den Tests wurden verschiedene Organismen eingesetzt. Das Pflanzenpathogen *Cladosporium herbarum*, der im Boden wachsende, oft Insekten-befallende Pilz *Metarhizium anisopliae* und die Fusarien *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. decemcellulare* und *F. proliferatum*, welche filamentöse ebenfalls im Boden lebende Pilze darstellen, die oft in Assoziation mit Pflanzen gebracht werden (Tabelle 2.3a). Ebenfalls wurde die Wirkung von NgTLP auf das Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* und die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* (Tabelle 2.3a & b) überprüft.

## Agardiffusionstest

Im Agardiffusionstest wurden verschiedene Pilze inklusive der Hefen getestet. Das Wachstum der Pilze wurde untersucht, indem diese auf verschiedene Medienplatten (LB, SFM, ME, YM) ausplattiert oder direkt in den Agar (Abschnitt 2.3.3) gegeben wurden. Die Experimente erfolgten jeweils im Dreifachversuch. NgTLP wurde konzentriert ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), vorliegend in Elutionspuffer, auf SFM-Platten mit den jeweiligen Pilzen gegeben. Als Negativkontrolle fungierte der Elutionspuffer. Nach einer Inkubationszeit von etwa einer Woche bei  $28^\circ\text{C}$  ließen sich aber weder ein Hemmhof noch ein Unterschied im Wachstum des Pilzes zwischen Kontrolle und Probe verzeichnen. Da der Elutionspuffer einen pH-Wert von 8 aufweist, das Sekret von jungen Kannen aber einen sauren pH-Wert besitzt (Moran & Clarke, 2010), wurde die Proteinlösung bzw. der Elutionspuffer 1:5 mit einem 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4) verdünnt.



Nachdem die Pilzsuspension auf ME-, YM- und SFM-Agar ausplattiert wurde, erfolgte die Zugabe von Probe und Kontrolle und die Platten wurden bei 28 °C bzw. 30 °C für die Hefe-Kulturen über mehrere Tage inkubiert. Das Wachstum der Hefen wurde ab dem ersten, das der Pilze ab dem dritten Tag beobachtet und dokumentiert.

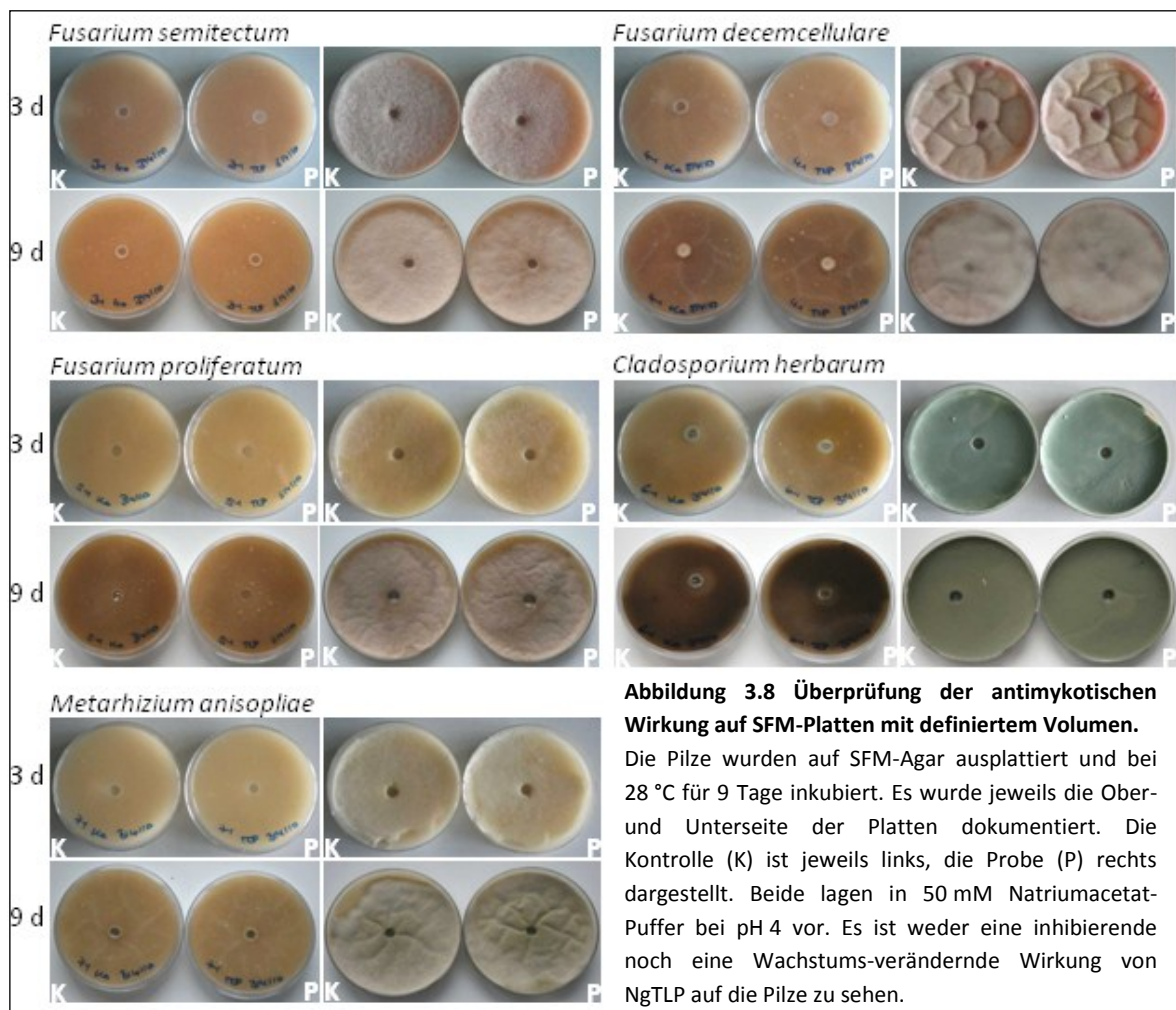


**Abbildung 3.7 Überprüfung der antimykotischen Wirkung von NgTLP auf SFM-Platten.**

Pilzwachstum nach Ausplattieren auf SFM-Platten und Inkubation bei 28 °C für mehrere Tage. Es ist kein Hemmhof durch die Zugabe von NgTLP (10 µg) zu sehen. Jedoch zeigen einige Arten eine Änderung des Wachstums in Form einer verringerten Bildung von Luftmyzel (3, 4, 5, 6). Es wurde jeweils die Ober- und Unterseite der Platten dokumentiert. Links ist die Kontrolle und rechts die Probe dargestellt. Beide lagen in 50 mM Natriumacetat-Puffer bei pH 4 vor. **1** *F. oxysporum*, **2** *F. semitectum*, **3** *F. decemcellulare*, **4** *F. proliferatum*, **5** *C. herbarum*, **6** *M. anisopliae*.



Schon nach ein bis zwei Tagen waren die Kontroll- und Proben-Platten der Hefen vollständig bewachsen, d.h. hier konnte keine Wachstums-inhibierende Wirkung von NgTLP nachgewiesen werden. Die mit Pilzen bewachsenen ME- und YM-Platten wurden nach vier Tagen miteinander verglichen. Weder bei den Kontroll- noch bei den Proben-Platten zeigte sich eine Inhibierung des Pilzwachstums durch einen Hemmhof (Abb. 3.6 & 7). Allerdings konnte eine Änderung der Wachstumsform bei den vier Pilzarten *F. decemcellulare*, *F. proliferatum*, *C. herbarum* und *M. anisopliae* auf SFM-Platten nach vier und noch deutlicher nach sechs Tagen beobachtet werden. Bei diesen Platten schien die Luftmyzelbildung in Gegenwart von NgTLP verringert zu sein (Abb. 3.7). Dieser Effekt zeigt sich aber nicht auf ME- oder YM-Platten. Bei *M. anisopliae* konnte die Änderung zwar auf ME-, nicht aber auf YM-Medium beobachtet werden (Abb. 3.6). Um auszuschließen, dass dieser Effekt aufgrund von Unterschieden in den Agarplatten, wie z.B. verschiedene Volumina, auftritt, wurden die zuvor genutzten Pilze auf SFM-Platten mit definiertem Volumen ausgestrichen und bei 28 °C inkubiert. *F. oxysporum* wurde dabei nicht getestet, da dieser schon nach etwa drei Tagen die Platte überwächst. Es wurden sowohl kleine, als auch große Petrischalen benutzt. In Abbildung 3.8 ist ein Teil der Ergebnisse dargestellt. Bei keinen der SFM-Platten mit definiertem Volumen zeigte sich eine Beeinflussung des Pilzwachstums bzw. der Luftmyzelbildung in Gegenwart von NgTLP im Vergleich zur Kontrolle.

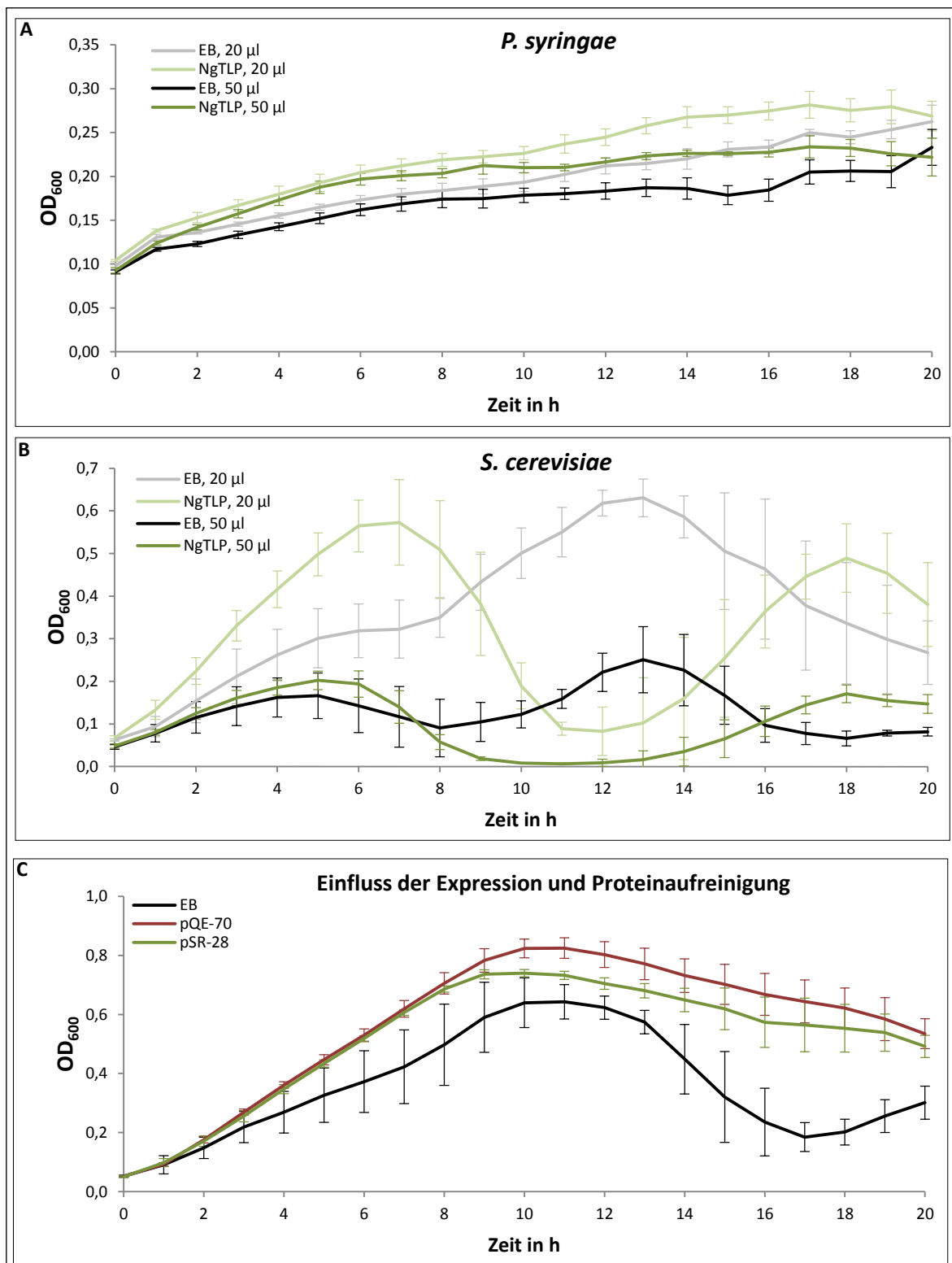


Weiterhin wurde über die direkte Zugabe der Pilzsuspension zum Agar überprüft, ob eine räumliche Begrenzung, z.B. eine unzureichende Diffusion des Proteins in den Agar, der Grund für den ausbleibenden Effekt von NgTLP auf die Pilze ist. Dazu wurde YM- bzw. ME-Agar verwendet. Allerdings konnte auch hier keine antimykotische Wirkung von NgTLP auf die getesteten Pilze festgestellt werden.

### Wachstumskurven

In Wachstumskurven wurde NgTLP auf antimikrobielle Wirkung gegen die Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe*, sowie das Bakterium *P. syringae* pv. *syringae* getestet. Dafür erfolgte eine Detektion des Wachstums der Hefen in ME- oder YM und von *P. syringae* in LB-Medium in Gegenwart von NgTLP. In Abbildung 3.9 sind Wachstumskurven von *P. syringae* (A) und *S. cerevisiae* (B) dargestellt. Dabei wurden 20 µl und 50 µl Elutionspuffer als Negativkontrolle oder NgTLP-Lösung eingesetzt und mit der jeweiligen Kultur auf 200 µl aufgefüllt. Nach der Messung ÜN zeigte sich bei *P. syringae* keine Veränderung im Wachstum in Anwesenheit von NgTLP im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* scheint das Bakterium außerdem eine größere Menge an Elutionspuffer (EB) zu tolerieren. Die Hefe wächst in Gegenwart von 50 µl Elutionspuffer oder NgTLP deutlich schlechter, als bei Verwendung von 20 µl, weshalb nur diese Wachstumskurven detaillierter beschrieben werden. Interessanterweise zeigt *S. cerevisiae* zu Beginn ein verstärktes Wachstum in Anwesenheit von NgTLP. Nach etwa 6 h hat die Zellzahl mit einer OD<sub>600</sub> von 0,6 ihren Höhepunkt erreicht und sinkt danach auf 0,1 ab. Nach einer Kultivierung von 12 h steigt die Zellzahl wiederum auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 an. In der Kontrolle ist die Anzahl der Zellen nach 13 h mit einer OD<sub>600</sub> von 0,65 am größten und sinkt danach stetig. Das verstärkte Wachstum in Gegenwart von 20 µl NgTLP zu Beginn der Kultivierung könnte mit der Expression bzw. der Proteinaufreinigung zusammenhängen. Diese findet über einen His-Tag statt, was zur Verunreinigung mit bakteriellen Proteinen führen kann, die dann der Hefe als Nahrung dienen könnte. Deswegen wurden zwei Expressionsreaktionen durchgeführt, wobei pQE-70 und pSR-28, ein pQE-70-Vektor mit TLP-Insert, in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und exprimiert wurden. Von beiden wurde das Proteinextrakt über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und 15 µl der Elutionsfraktionen in Wachstumsassays eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Wachstumssteigerung zu Beginn der Kultivierung wahrscheinlich durch bakterielle Überreste verursacht wird, die bei der Aufreinigung des Proteins in die Probe gelangen. Die Wachstumskurven zeigen das gleiche Schema in Gegenwart der Elutionsfraktionen von pQE-70 und pSR-28 (Abb. 3.9, C). Dieses stimmt aber nicht mit den vorherigen Beobachtungen überein, da hier in beiden Fällen die Anzahl der Zellen nicht nach 6 h zurück geht.

In weiteren Experimenten, in denen auch die Wirkung von NgTLP auf das Wachstum der Hefe *S. pombe* getestet wurde, zeigten sich aber beide Wachstumsformen in Gegenwart von Elutionspuffer oder NgTLP. Daher ist dieser Effekt nicht NgTLP-gebunden und wurde nicht weiter verfolgt.



**Abbildung 3.9** Wachstumsassay mit *P. syringae* (A) und *S. cerevisiae* (B & C).

NgTLP wurde auf eine potentielle antimikrobielle Wirkung getestet. Dabei fanden die Organismen *P. syringae* (A) und *S. cerevisiae* (B) Verwendung. Die Messung erfolgte in Gegenwart von 20 bzw. 50 µl Elutionspuffer (EB) oder Probe (NgTLP). Das Wachstum von *P. syringae* wird nicht negativ von NgTLP beeinflusst (A). *S. cerevisiae* zeigt ein nur geringes Wachstum bei 50 µl Kontrolle oder Probe. Außerdem scheint NgTLP dieses positiv und später negativ zu beeinflussen. C Getestet wurde die Wirkung der Elutionsfraktionen nach Aufreinigung der Expressionskulturen von pQE-70 und pSR-28 auf *S. cerevisiae*. Es ist wiederum eine Wachstumszunahme am Beginn der Kultivierung zu erkennen. Allerdings wirken die Proben pQE-70 und pSR-28 ähnlich auf das Wachstum von *S. cerevisiae*. (Fehlerbalken: Standardabweichung, n = 6)

## Überprüfung der hydrolytischen Aktivität

In der Literatur wurden TLPs beschrieben, die  $\beta$ -1,3-Glucanase-Aktivität besitzen (Liu *et al.*, 2010). Um zu überprüfen, ob NgTLP hydrolytische Aktivität besitzt, wurden verschiedene Kohlenhydrat-Substrate getestet.

### Glucanase-Test

Für einige TLPs wird in der Literatur Glucanase-Aktivität beschrieben. Um dies zu testen wurden die Substrate  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucopyranosid verwendet. Jedoch konnte weder  $\alpha$ - noch  $\beta$ -Glucanase-Aktivität für NgTLP beobachtet werden. Da aber beide Substrate nur Exo-Glucanasen nachweisen, erfolgte eine weitere Untersuchung dieser Aktivität über den Substrat-Platten-Test.

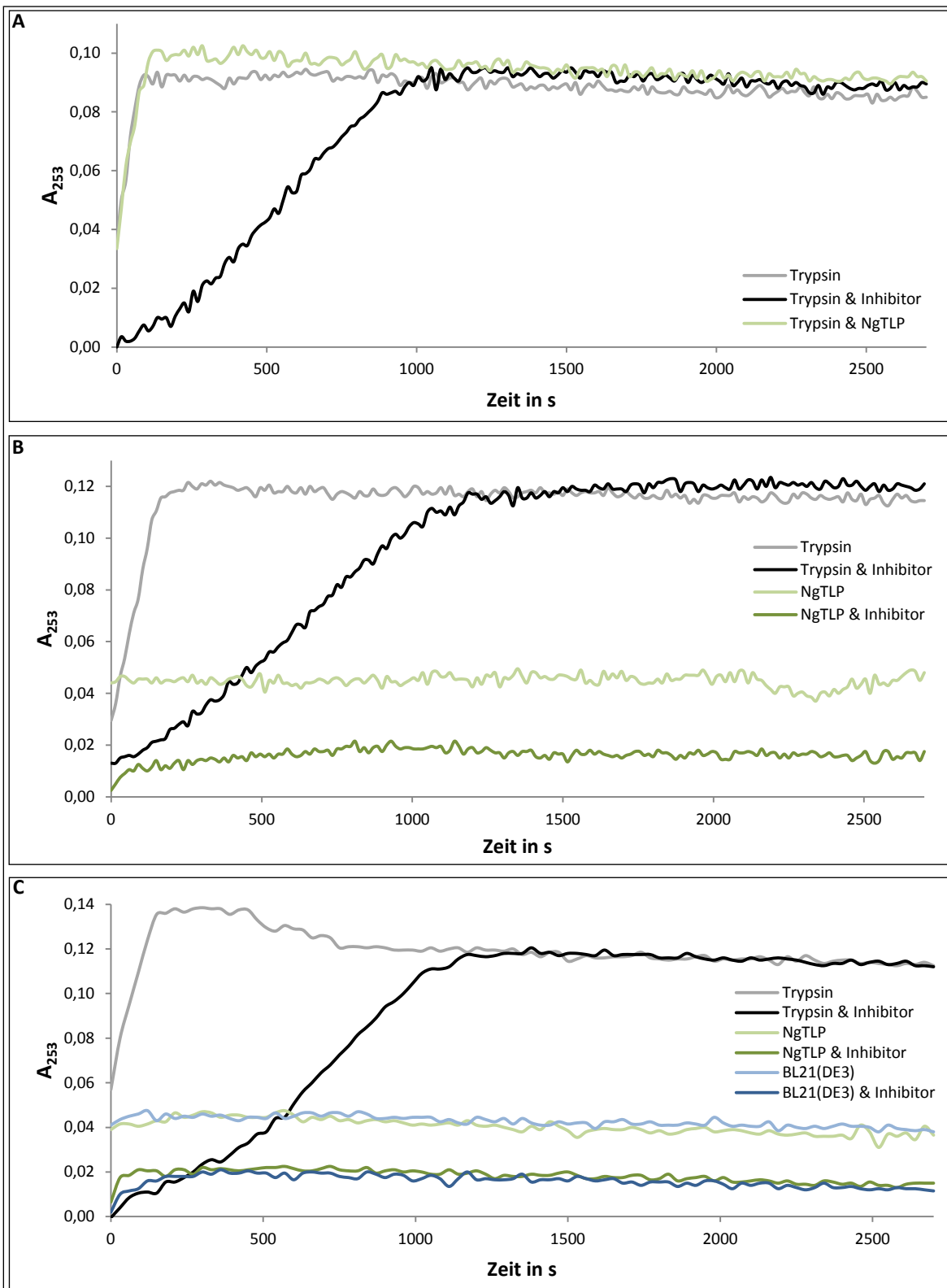
### Substrat-Platten-Test

Im Vorversuch wurden 50  $\mu$ l von NgTLP in Elutionspuffer, sowie Positiv- und Negativkontrolle auf die jeweiligen Substratplatten gegeben. Bei CM-Cellulose und Laminarin war eine Hydrolyse des Substrats durch einen klaren Ring um die Positivkontrolle zu erkennen, nicht aber bei der Probe. Da NgTLP im Elutionspuffer bei pH 8 vorlag, wurde die Lösung mit einem 50 mM Natriumacetat-Puffer verdünnt, der pH-Werte im sauren Bereich (3,5; 4,0; 4,5; 5,0 & 5,5) aufwies. Aber auch hier konnte keine hydrolytische Aktivität für NgTLP nachgewiesen werden (Abb. 6.2).

In beiden Versuchen war keine Zersetzung von Xylan, auch nicht durch die Xylanase, beobachtet worden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Unlöslichkeit des Substrats in  $H_2O$ , im Gegensatz zu CM-Cellulose und Laminarin, sein.

## Analyse der Trypsin-inhibierenden Funktion

Das TLP Zeamatin aus Mais besitzt u.a. die Eigenschaft Trypsin zu inhibieren (Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2001). Diese Funktion lässt sich über die Hemmung der Hydrolyse von BAEE durch Trypsin über den *Enzymatic Assay of Trypsin Inhibitor* (Sigma-Aldrich) nachweisen. Im Vorversuch erfolgte die Messung der hydrolytischen Aktivität von Trypsin sowie deren Hemmung durch den Inhibitor bzw. NgTLP (Abb. 3.10, A). Dabei konnte keine hemmende Wirkung von NgTLP auf Trypsin festgestellt werden. Durch die Zugabe des Proteins scheint sich die hydrolytische Spaltung des Substrats durch Trypsin zu steigern. Dies könnte bedeuten, dass NgTLP Protease-Aktivität besitzt. Deswegen wurde im nächsten Versuch überprüft, ob NgTLP BAEE spaltet und dies durch Zugabe des Inhibitors gehemmt werden kann (Abb. 3.10, B). In Anwesenheit von NgTLP und BAEE war eine Absorption messbar, die allerdings über die gesamte Messung bei 0,04 lag. Mit der Zugabe des Inhibitors verringerte sich die Absorption (0,01). Bei der Proteinaufreinigung über einen His-Tag treten oft Verunreinigungen mit bakteriellen Substanzen auf. Deshalb wurde der Test mit einem ebenso wie NgTLP über Ni-NTA aufgereinigten Extrakt von *E. coli* BL21(DE3) wiederholt (Abb. 3.10, C). Dabei war ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Von einer hydrolytischen Spaltung von BAEE wurde hier nicht ausgegangen, da keine Zunahme der enzymatischen Aktivität pro Zeiteinheit zu sehen war. Somit besitzt NgTLP weder Protease-Aktivität, noch kann diese über NgTLP inhibiert werden.



**Abbildung 3.10 Ergebnisse des Trypsin-Inhibitor-Tests.**

**A** Die hydrolytische Spaltung von BAEE durch Trypsin, sowie deren Hemmung durch den Trypsin-Inhibitor oder NgTLP wurde gemessen. NgTLP inhibiert Trypsin nicht, sondern scheint dessen Aktivität zu verstärken. **B** Es wurde die hydrolytische Aktivität von Trypsin und NgTLP, sowie die Hemmung der Proteine über den Inhibitor getestet. In Anwesenheit von NgTLP ist eine erhöhte Absorption zu verzeichnen, die durch Zugabe des Inhibitors verschwindet. **C** Neben Trypsin und NgTLP wurde ein *E. coli* BL21(DE3)-Extrakt untersucht, wobei die resultierenden Graphen den der NgTLP-Probe entsprachen.



### 3.2.2 Chitinase aus *Nepenthes rafflesiana* (NrChit1)

#### Proteinstruktur

Das Vorkommen von Chitinasen im Verdauungssekret von *Nepenthes*-Kannen wurde schon in früheren Studien beschrieben (Eilenberg, *et al.*, 2006; Hatano & Hamada, 2008). Die hier untersuchte putative Chitinase aus *N. rafflesiana* wird von einer mRNA, die aus 879 bp besteht, kodiert. Das Protein enthält 292 AS, wobei die ersten 26 AS ein putatives Signalpeptid bilden und nach Sekretion aus der Zelle abgespalten werden. Das reife Protein enthält somit 266 AS und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 31 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 3,86. Analysen mit Scanprosite ergaben, dass die Sequenz das Chitinase\_18-Motiv ([LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVME]-[DN]-x-E, Prosite-Nr.: PS01095) von AS 119 bis 127 (reifes Protein) trägt. Dieses bildet das aktive Zentrum von Chitinasen der Familie 18. Außerdem weist das Protein eine mögliche Position für N-Glykosylierung (N<sup>143</sup>, reifes Protein), sowie sechs konservierte Cystein-Reste, die theoretisch drei Disulfidbrücken bilden können, auf (Abb. 3.11).

MKTHYSSAILPILTLFVFLSINPSHSGIAVYWGQNGNEGLSDT**C**ATGNYNVVLVSFLTTFGNGQTPVLNLA  
GH**C**DPSSNG**C**TGLSTDITS**C**QNQGIKVLVSLGGASGSYSVSTDDADQVAAYLWNNYLGGQSDSRPLGSAV  
LDGIDFDIESGSDNYWGD LATA LK**N**YSQSVLVSAAPQ**C**PYPDAHLDLAIATGIFDYVWVQFYNNEQ**C**EYVT  
DDTNLLSAWNQWTSSQANVVFLGLPASTDAASSGYISPDVLISQVLPSIKASSKYGGVMLWSKYDNGYSS  
AIKDSV

#### Abbildung 3.11 Abgeleitete AS-Sequenz von NrChit1.

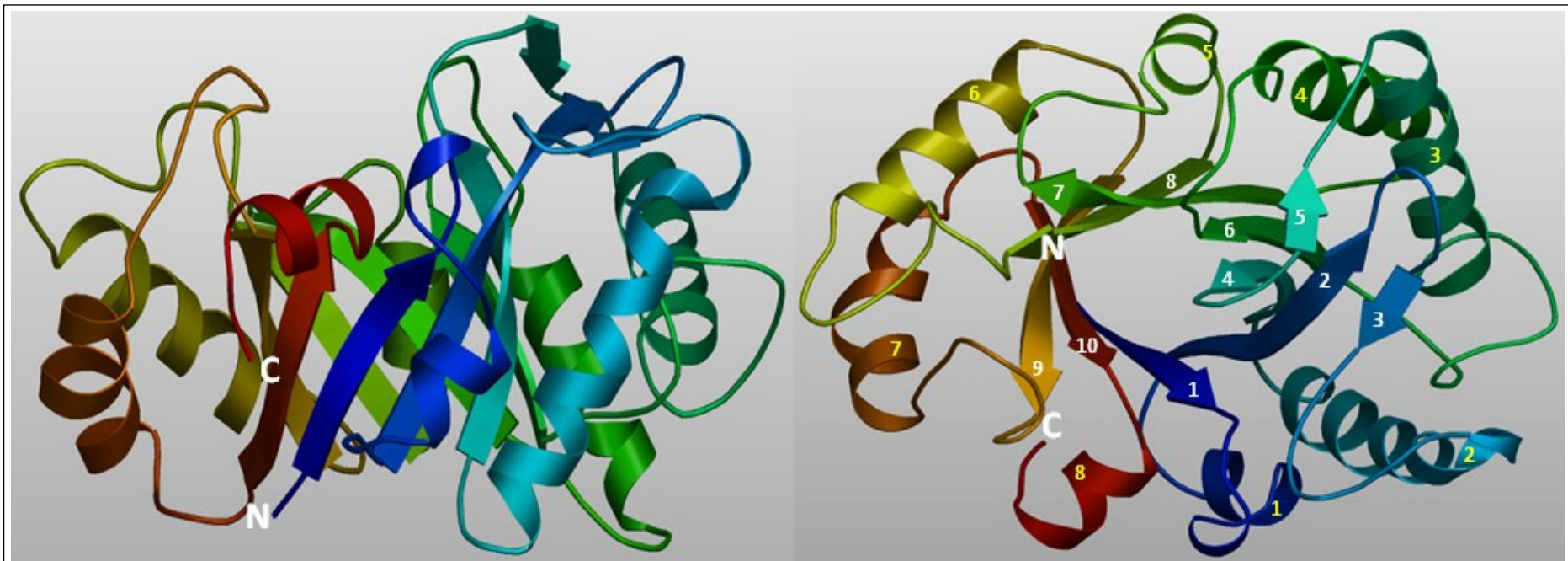
NrChit1 besteht aus 292 AS, wobei N-terminal 26 AS das Signalpeptid (grün) bilden. Das reife Protein besitzt 6 konservierte C-Reste (rot & fett), die theoretisch 3 Disulfidbindungen bilden könnten. Außerdem weist das Protein am N<sup>143</sup> (rot unterlegt) eine mögliche Position für N-Glykosylierung auf. Die Sequenz trägt das Chitinase\_18-Motiv (PS01095, [LIVMFY]-[DN]-G-[LIVMF]-[DN]-[LIVME]-[DN]-x-E, grau unterlegt), welches das aktive Zentrum bei Chitinasen der Familie 18 darstellt.

Die 3D-Struktur von NrChit1 (ABF74624) wurde mit SWISS MODEL anhand der Kristallstruktur von Hevamine (1HVQ\_A, Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1994), einem Enzym mit Chitinase- und Lysozym-Aktivität aus dem Gummibaum (*Hevea brasiliensis*), modelliert. Dazu wurden die Sequenzen der reifen Proteine genutzt, welche eine Ähnlichkeit von 64 % aufweisen (Abb. 3.12). Nach diesem Modell bildet das Protein ein ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Fass, welches auch als TIM-Barrel bezeichnet wird und unter den Chitinasen der Familie 18 stark konserviert ist (Abb. 3.13). Das ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Fass wird aus 8 parallelen  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_6$ - $\beta_{10}$ ) gebildet, welche von 8  $\alpha$ -Helices ( $\alpha_1$ - $\alpha_8$ ), die antiparallel zu diesen angeordnet sind, umgeben sind. Zusätzlich weist NrChit1 noch zwei kurze  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta_3$  &  $\beta_5$ ) auf, die nicht an der Bildung des TIM-Barrels beteiligt sind (Abb. 3.13, rechts). Das Laufverhalten von NrChit1 unterscheidet sich nicht in der nativen oder SDS-PAGE (Abb. 6.1). Dies lässt auf einen Monomeren Status des Proteins schließen.

1HVQ_A	GGIAIYWGQNGNEGTLTQT <b>C</b> STRKYSYVNIAFLNKFNGQTPQINLAGH <b>C</b>	50
ABF74624	SGIAVYWGQNGNEGTLSDT <b>C</b> ATGNYNVYLVSFLLTFGNGQTPVLNLAGH <b>C</b>	50
	.***:*****:***:*.**.:**..*****:*****	
1HVQ_A	NPAAGG <b>C</b> TIVSNGIRS <b>C</b> QIQGIKVMLSLGGGIGSYTLASQADAKNVADYL	100
ABF74624	DPSSNG <b>C</b> TGLSTDITS <b>C</b> QNQGIKVLLSLGGASGSYSLVSTDDADQVAAYL	100
	:*:.***:*.**.* ** *****:*****.***:*.** **.:** **	
1HVQ_A	WNNFLGGKSSSRPLGDAVL <b>LDGIDFDIE</b> HGSTLYWDDLARYLSAYSKQGKK	150
ABF74624	WNNYLGQSDSRPLGSAVL <b>LDGIDFDIE</b> SGSDNYWGLATALKNYSQS---	147
	***:***:*.*****.***** ** **.*****.**.*:.	
1HVQ_A	VYLTAAP <b>Q</b> CPFPDRYLGTALNTGLFDYVWVQFYNNPP <b>C</b> QYSSGNINNIIN	200
ABF74624	VLVSAAP <b>Q</b> CPYPDAHLDLAIATGIFDYVWVQFYNN <b>Q</b> CEYVTDDTN-LLS	196
	*:*****:***:*.**.:**.:***** **.*:*.**.:**.:*	
1HVQ_A	SWNRWTT SINAGKIFLGLPAAPEAGSGYVPPDVLISRLPEIKKSPKYG	250
ABF74624	AWNQTSSQ-ANVFLGLPASTDAASSGYISPDVLISQVLPSIKASSKYG	245
	:**.**:*.**.: *****:*.**.**:*****:***.***.*.***	
1HVQ_A	GVMLWSKFYDDKNGYSSSILDSV	273
ABF74624	GVMLWSKYD--NGYSSAIKDSV	266
	*****:*** *****:*** **	

**Abbildung 3.12 Alignment von Hevamine aus dem Gummibaum (1HVQ\_A) und NrChit1 (ABF74624).**

Hier wurde jeweils der aktive Teil der Proteine (ohne Signalpeptid) miteinander verglichen, welcher einer Ähnlichkeit von 64 % entspricht. Grau unterlegt ist das Chitinase\_18-Motiv (LDGIDFDIE), welches das aktive Zentrum von Chitinasen der Familie 18 darstellt. Außerdem enthalten beide Proteine 6 konservierte Cystein-Reste (rot & fett), die 3 Disulfidbrücken bilden könnten.



**Abbildung 3.13** Anhand von Hevamine errechnete 3D-Struktur von NrChit1 in zwei verschiedenen Ansichten.

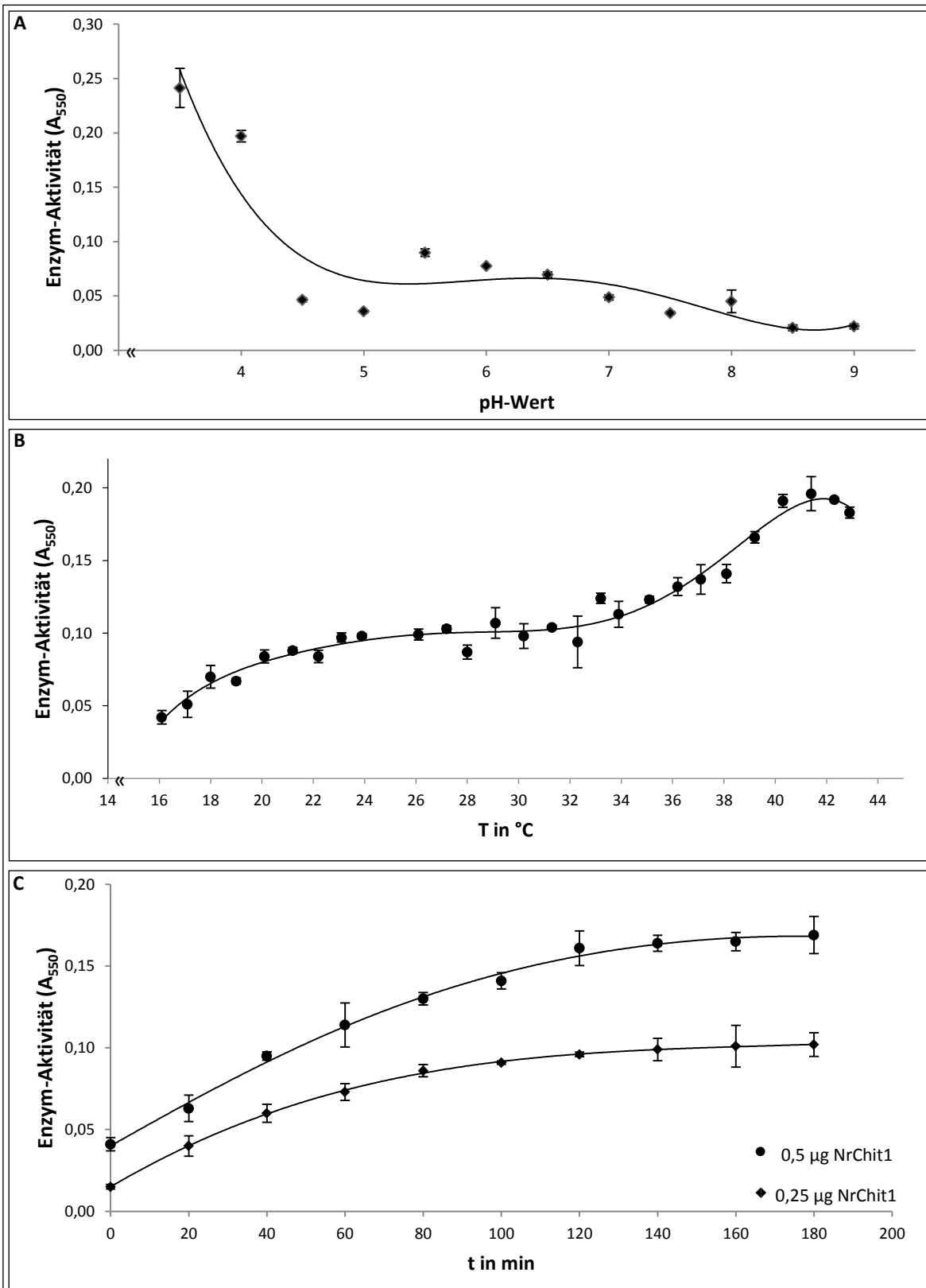
Das Protein bildet ein  $(\beta\alpha)_8$ -Fass (TIM-Barrel), geformt von 8 parallelen  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta_1, \beta_2, \beta_4, \beta_6, \beta_{10}$ ), die von 8 antiparallel angeordneten  $\alpha$ -Helices ( $\alpha_1, \alpha_8$ ) umgeben werden. Zusätzlich enthält das Molekül zwei kurze  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta_3$  &  $\beta_5$ ). (Nummerierung (rechts): weiß,  $\beta$ -Faltblätter; gelb,  $\alpha$ -Helices).

## Untersuchung der chitinolytischen Aktivität

Um zu testen, welche Chitinase-Aktivität NrChit1 besitzt, wurden verschiedene, markierte Substrate verwendet. Zu Beginn erfolgte die Bestimmung der Aktivität fluorometrisch mit dem *Chitinase Assay Kit* (Sigma-Aldrich). Dieser enthält drei verschiedene mit 4-Methylumbelliferon (4MU) markierte Substrate, über dessen Freisetzung bei hydrolytischer Spaltung sich Chitobiosidase- (4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>), Exochitinase- (4MU-(GlcNAc)<sub>1</sub> & 4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>) und Endochitinase-Aktivität (4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub>) fluorometrisch nachweisen lassen. Allerdings zeigte NrChit1 bei keinem dieser Substrate chitinolytische Eigenschaften. Dies sind jedoch kurzkettige Substrate (Dimer, Trimer, Tetramer). Viele Endochitinasen können nur längere *N*-Acetylglucosamin-Ketten hydrolysieren. Deshalb wurde ein weiteres Substrat, das polymere, mit dem Farbstoff *Remazol Brilliant Violet* markierte CM-Chitin, verwendet. Hier konnte eine Spaltung durch NrChit1 detektiert werden. Um das Protein weiter zu charakterisieren wurde zuerst das pH-Optimum bestimmt. Dabei fanden verschieden Puffer Verwendung, deren pH-Bereiche sich teilweise überlappen (Tabelle 2.1). Die Konzentration von NrChit1 betrug 0,5 µg Protein pro Ansatz und die Reaktionen wurden bei 37 °C für 3 h inkubiert. Die Messung ergab ein pH-Optimum im sauren Bereich, wobei die Aktivität mit einer Absorption bei 550 nm von 0,25 bei pH 3,5 am höchsten war (Abb. 3.14, A). Der nächste Schritt war die optimale Temperatur des Enzyms zu bestimmen. Dazu wurden 0,25 µg Enzym pro Ansatz in einem 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 3,5) verwendet und die Aktivität von 16 bis 43 °C für 3 h gemessen. Dabei wurde deutlich, dass das Enzym bei 16 °C nur eine geringe Aktivität besitzt ( $A_{550} = 0,05$ ), die aber mit steigender Temperatur zunimmt. Von 20 bis rund 34 °C bleibt die Aktivität mit relativ konstant ( $A_{550} = 0,1$ ). Diese steigt dann aber rasch an, bis sie bei 40 bis 42 °C ihr Maximum ( $A_{550} = 0,2$ ) erreicht (Abb. 3.14b, B). Da das Substrat nicht in höheren Konzentrationen als 2 mg/ml verfügbar ist, war es nicht möglich den  $K_m$ -Wert des Enzyms zu bestimmen. Deshalb wurde die Substratsättigung von NrChit1 getestet (Abb. 13.14, C). Das Enzym wurde dabei in einer Konzentration von 0,25 oder 0,5 µg pro Reaktion eingesetzt. Die Messung der Aktivität erfolgte in 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 3,5) und einer Temperatur von 41 °C. Die Reaktionen erfolgten in einem Zeitraum von 3 h, wobei alle 20 min Ansätze entnommen und gestoppt wurden. Die Überstände der Reaktionen wurden bis zur Messung der Absorption bei 4 °C gelagert. Die Substratsättigung trat bei Verwendung von 0,25 µg Enzym nach 60 min und bei 0,5 µg NrChit1 nach 90 min ein. Die Eigenschaften von NrChit1 sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.2 Eigenschaften der Endochitinase (NrChit1) aus *N. rafflesiana*.**

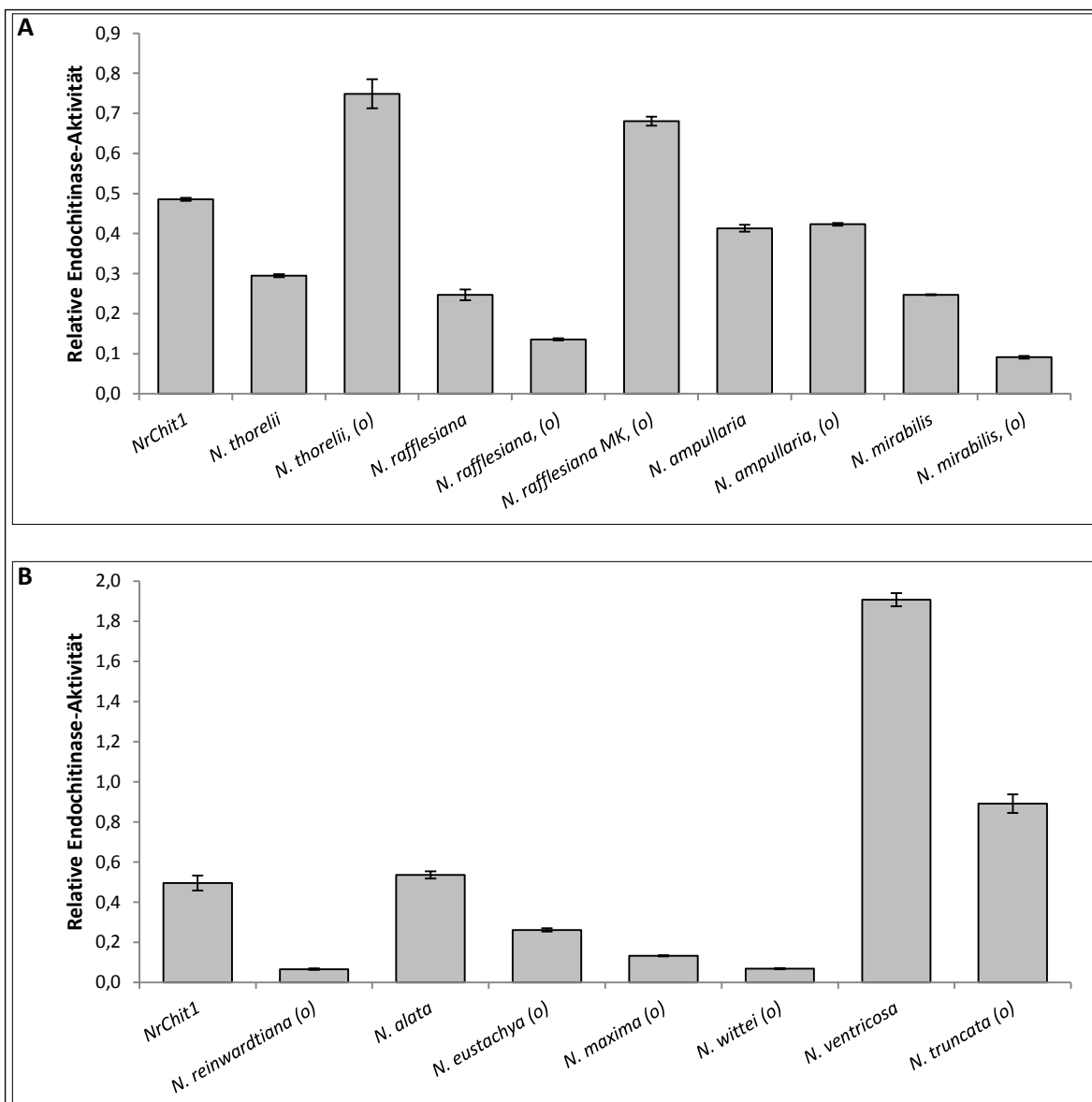
Proteincharakteristika	Spezifität
Enzym-Aktivität	Endochitinase
Glycosidhydrolase-Familie	18
Klassifizierung	Klasse III
Substratspezifität	CM-Chitin-RBV
Temperatur-Optimum	41 °C
pH-Optimum	3,5
Molekulargewicht	31 kDa
Isoelektrischer Punkt	3,86



**Abbildung 3.14 Charakterisierung von NrChit1.**

**A** Bestimmung des pH-Optimums. Das Enzym weist im sauren Bereich (pH 3,5) die höchste Aktivität auf. Es wurden 0,5  $\mu\text{g}$  NrChit1 pro Reaktion eingesetzt. **B** Bestimmung des Temperatur-Optimums bei pH 3,5. NrChit1 erreicht die maximale Aktivität bei rund 41 °C. Es wurden 0,25  $\mu\text{g}$  Enzym pro Reaktion eingesetzt. **C** Bestimmung der Substratsättigung. Die Sättigung des Enzyms mit Substrat tritt nach 60 min (0,25  $\mu\text{g}$  NrChit1) bzw. 120 min (0,5  $\mu\text{g}$  NrChit1) ein. (Fehlerbalken: Standardabweichung,  $n = 6$ ).

Die Identifizierung von NrChit1 erfolgte über einen proteomischen Ansatz aus dem Verdauungsssekret geschlossener Kannen verschiedener *Nepenthes*-Arten. Daher sollte die Endochitinase-Aktivität auch in der Kannenflüssigkeit detektierbar sein. Um dies zu untersuchen wurde Kannensekret von verschiedenen Arten entnommen. Von diesem wurden 50 µl pro Reaktion verwendet. Dabei diente die exprimierte NrChit1 (55 ng) in 50 mM Natriumacetat-Puffer als Positivkontrolle. Wenn möglich wurde die Aktivität des Sekrets geschlossener und offener Kannen getestet. Dies konnte bei *N. thorelii*, *N. rafflesiana* und deren Hybride „Mizuho Kondo“, *N. ampullaria* und *N. mirabilis* verwirklicht werden, da diese zum Zeitpunkt des Experiments genügend Kannen aufwiesen. Die Messungen fanden für 15 h und 48 h bei 41 °C statt. Alle getesteten Kannenflüssigkeiten zeigten Endochitinase-Aktivität (Abb. 3.15).



**Abbildung 3.15 Relative Endochitinase-Aktivität (1 µg Protein & 10 h) im Sekret von Kannen verschiedener *Nepenthes*-Arten.**

Die Reaktionen fanden bei 41 °C für 15 h (A) bzw. 48 h (B) statt. Die relative Endochitinase-Aktivität wurde für 1 µg Protein und 10 h berechnet. Die Flüssigkeit offener Kannen ist mit (o), die geschlossener nicht gekennzeichnet. Die *N. rafflesiana*-Hybride „Mizuho Kondo“ wurde mit MK abgekürzt. (Fehlerbalken: Standardabweichung, n = 3).

Da der Proteingehalt des Verdauungssekrets zwischen verschiedenen Kannen und Arten variiert, wurde die relative Aktivität pro 1 µg Gesamtprotein und 10 h berechnet. Interessanterweise ist in *N. rafflesiana* und *N. mirabilis* die Aktivität in geschlossenen Kannen höher als in offenen Kannen. *N. ampullaria* zeigt in beiden Kannen die gleiche Aktivität und nur in *N. thorelii* steigt diese im Sekret offener Kannen an. Allerdings ist weder bekannt, ob die Endochitinase induzierbar ist, noch ob andere Chitinasen mit gleicher Substratspezifität im Kannensekret vorkommen. Außerdem kann nur für die Hybride *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“ mit Sicherheit gesagt werden, dass es zum Beutefang kam, da die Flüssigkeit Ameisen enthielt. Diese könnten evtl. die Expression der Chitinase induzieren. Interessant sind ebenfalls die Unterschiede der relativen Aktivität in geschlossenen Kannen der verschiedenen Arten. Diese lag zwischen Werten von 0,25 (*N. rafflesiana* und *N. mirabilis*, Abb. 3.15, A) und 1,9 (*N. ventricosa*, Abb. 3.15, B).

### 3.3 Mikropräparation

Es wird vermutet, dass die Expression und Sekretion der Verdauungsproteine in die Kannenflüssigkeit über die sekretorischen Zellen der Drüsen erfolgt (Moran & Clarke, 2010). Zur Isolierung der Drüsen wurde ein Mikropräparationsverfahren unter Nutzung des aureka®-Systems entwickelt. Die Plattform beinhaltet neben dem Mikromanipulator das Stereomikroskop SteREO Lumar V12 (Zeiss). Dieses wurde außer zur Mikropräparation auch dazu verwendet, die Verdauungszone von Kannen verschiedener *Nepenthes*-Arten zu vergleichen. Das Präparationsverfahren wurde zusammen mit der Firma aura optik GmbH entwickelt.

#### 3.3.1 Die Verdauungszone verschiedener *Nepenthes*-Kannen

Zum Vergleich der Verdauungszonen wurden die Kannen von acht verschiedenen *Nepenthes*-Arten, *N. thorelii*, *N. superba*, *N. gracilis*, *N. fusca*, *N. ampullaria*, *N. mirabilis*, *N. ventricosa* und *N. maxima* herangezogen. Eine Übersicht der Verdauungszonen und der Drüsen ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Die genaue Größe und Anzahl der Drüsen wurden in Tabelle 3.3 aufgelistet. Die Anzahl der Drüsen pro cm<sup>2</sup> variiert stark zwischen den einzelnen Arten und reicht von 40 (*N. ventricosa*) bis 228 (*N. superba*). Die sekretorischen Zellen bilden einen Zusammenschluss von unterschiedlicher Größe und Form.

**Tabelle 3.3 Anzahl und Größe der Drüsen verschiedener *Nepenthes*-Arten.**

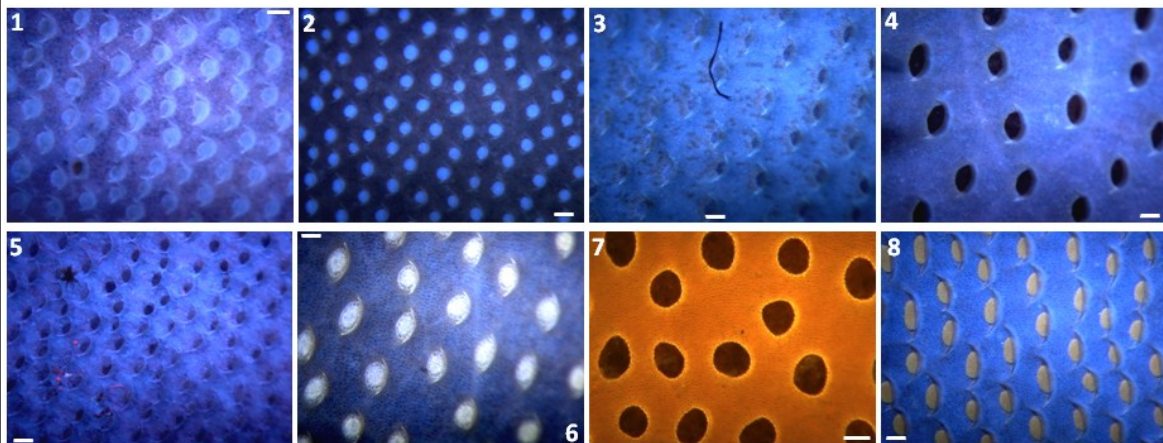
Nr.	<i>Nepenthes</i> -Art	Drüsen / cm <sup>2</sup>	Drüsenbreite (µm)	Drüsentiefe (µm)	A <sub>Drüsen</sub> [mm <sup>2</sup> ] / cm <sup>2</sup>
1	<i>N. thorelii</i>	140	133	139	2,03
2	<i>N. superba</i>	228	93	107	1,78
3	<i>N. gracilis</i>	94	125	100	0,92
4	<i>N. fusca</i>	44	200	150	1,04
5	<i>N. ampullaria</i>	225	100	100	1,77
6	<i>N. mirabilis</i>	52	240	140	1,37
7	<i>N. ventricosa</i>	40	207	179	1,16
8	<i>N. maxima</i>	100	200	140	2,20



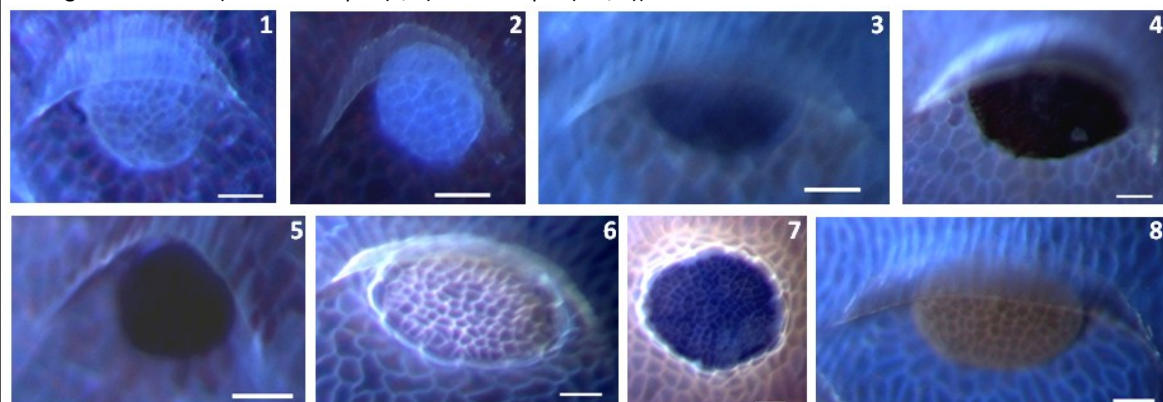
Da diese den funktionellen Teil der Drüse darstellen, sind in den nachfolgenden Abschnitten mit dem Begriff Drüsen die sekretorischen Zellen gemeint. Die Breite der Drüsen reicht von 90 bis 240  $\mu\text{m}$  und die Tiefe von 100 bis 180  $\mu\text{m}$ . Die Drüsen sind rund oder oval und werden kaum (*N. mirabilis*) oder etwa bis zur Hälfte (z.B. *N. thorelii*) von einer Haube bedeckt, welche von epidermalen Zellen gebildet wird. Interessanterweise haben Arten mit den größten Drüsen eine geringere Anzahl pro Fläche. Beispielsweise besitzt *N. ventricosa* nur 40 Drüsen pro  $\text{cm}^2$ , die aber einen Durchmesser von rund 200  $\mu\text{m}$  zeigen. Im Gegensatz dazu weist *N. superba* eine höhere Drüsendichte auf (230 Drüsen/ $\text{cm}^2$ ), diese sind aber mit einem Durchmesser von etwa 100  $\mu\text{m}$  deutlich kleiner. Um zu sehen, ob sich der Drüsenanteil in den Kannen verschiedener Arten ausgleicht, wurde die Fläche pro Drüse berechnet und mit deren Anzahl pro  $\text{cm}^2$  multipliziert (Tabelle 3.3). Die Gesamtflächen der Drüsen betragen durchschnittlich 1,53 (+/- 0,48)  $\text{mm}^2$  pro  $\text{cm}^2$  und schwanken von etwa einem (Nr.: 3, 4, 6 & 7) bis zwei  $\text{mm}^2$  pro  $\text{cm}^2$  (1, 2, 5 & 8).

**Abbildung 3.16 Drüsenzone verschiedener *Nepenthes*-Arten.**

1 *N. thorelii*, 2 *N. superba*, 3 *N. gracilis*, 4 *N. fusca*, 5 *N. ampullaria*, 6 *N. mirabilis*, 7 *N. ventricosa*, 8 *N. maxima*.



Für Nr. 1-6 und 8 wurde der Lumar 01 UV-Filter (Zeiss) mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm verwendet. Bei Nr. 7 fand das Lumar Filter Set 09 (Zeiss) mit einer Anregung von 450-490 nm Verwendung. Die Dokumentation erfolgte bei Auflicht (Balken: 200  $\mu\text{m}$  (1, 7) bzw. 500  $\mu\text{m}$  (2-6, 8)).



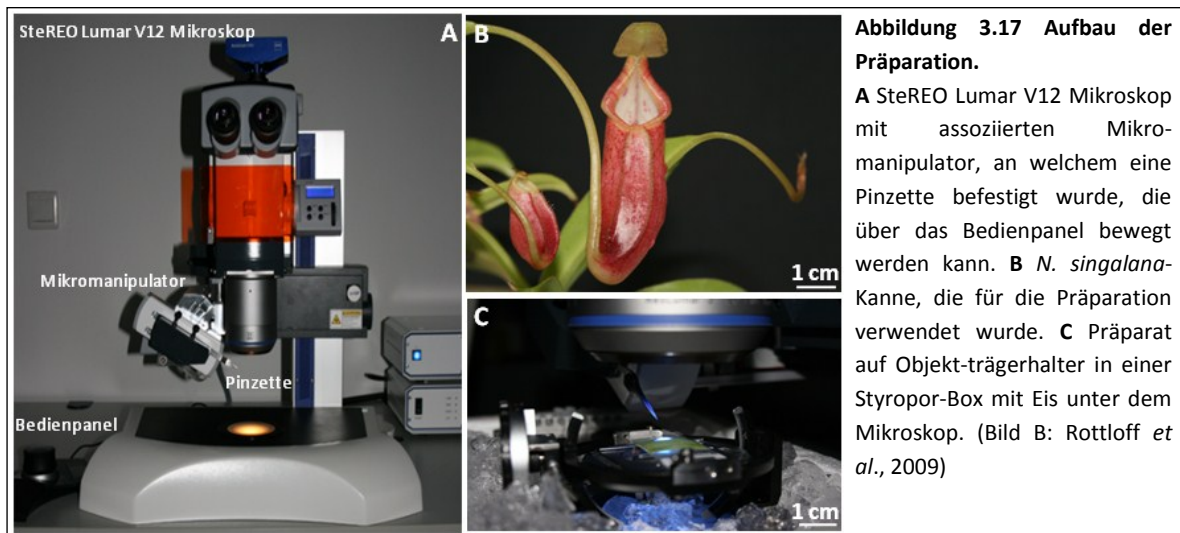
Es wurde der UV-Filter Lumar 01 (Zeiss) mit einer Anregungswellenlänge von 365 nm verwendet. Die Dokumentation erfolgte bei Auflicht (Balken: 50  $\mu\text{m}$ ).



### 3.3.2 Isolierung verschiedener Gewebearten aus *Nepenthes*-Kannen

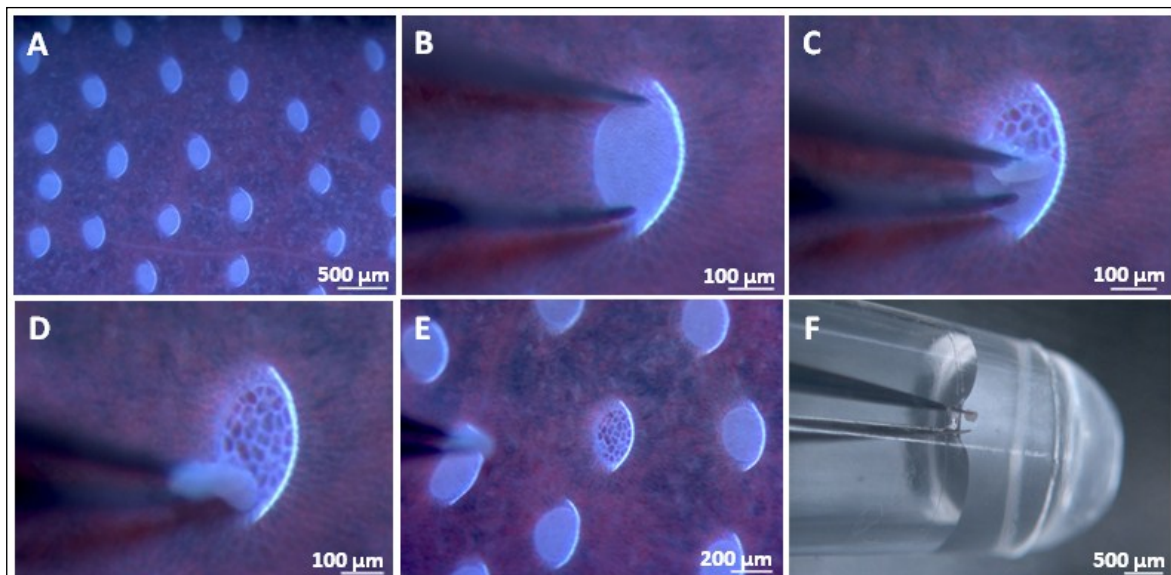
#### Präparationsaufbau

Für die Präparation der sekretorischen Zellen wurde als Instrument eine Mikropinzette gewählt. Diese wurde am Manipulator befestigt (Abb. 3.17, A). Das Präparat bildete ein Teil der Verdauungszone der Kanne (Abb. 3.17, B), welcher ungefähr eine Größe von 1 bis 2 cm<sup>2</sup> besaß. Dieser wurde mit Klebeband auf einem Objektträger befestigt. Bei der Präparation bildete der Winkel von Pinzette zum Objekt einige Schwierigkeiten, die aber durch die Benutzung eines Objektträgerhalters mit beweglicher Oberfläche (Universaldrehtisch) behoben werden konnten. Die sekretorischen Zellen ließen sich am besten mit einem Winkel zwischen Pinzette und Präparat von etwa 135° entnehmen. Da in späteren Experimenten Nukleinsäuren aus dem Gewebe extrahiert werden sollten, fand die Präparation auf Eis statt. Dazu wurde eine Styropor-Box, die den Objektträgerhalter mit Präparat enthielt, mit Eis gefüllt (Abb. 3.17, C).



#### Drüsenpräparation

Die einzelnen Präparationsschritte sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Das Objekt wurde so zur Pinzette ausgerichtet, dass der nicht von der Haube bedeckte, offene Teil der Drüse zugänglich ist (A). Die Pinzette wird über das Bedienpanel auf die Drüse zubewegt und die Greifarme an die beiden Ränder der Drüse angelegt (B). Durch die Bewegung des linken zum rechten Greifarm lassen sich die sekretorischen Zellen entfernen (C & D). Die Drüse zusammen mit der Pinzette wird dann vom Präparat entfernt (E) und kann anschließend z.B. in einem PCR-Gefäß, welches hier 10 µl ddH<sub>2</sub>O enthielt, abgelegt werden (F). Da in späteren Experimenten die Proteinexpression der Drüsen mit der des epidermalen Gewebes verglichen werden soll, wurde auch dieses präpariert. Dabei wurde versucht einen Bereich zu entfernen, dessen Größe dem der Drüsen entsprach, um die gleiche Menge an Gewebe zu sammeln. Auffällig hierbei war, dass dieses Gewebe von einer wachsartigen Substanz bedeckt zu sein schien.



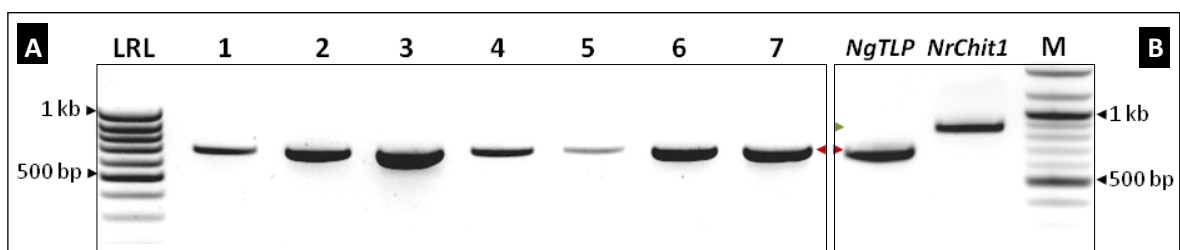
**Abbildung 3.18 Mikropreparation einzelner Drüsen.**

**A** Die innere Oberfläche der Verdauungszone zeigt eine Vielzahl von Drüsen. **B** Die Pinzette wird an den Seiten der Drüse angelegt. **C** Durch das Bewegen des linken Greifarms lassen sich die sekretorischen Zellen vom restlichen Gewebe lösen. **D** Die Drüse ist zwischen den beiden Armen der Pinzette befestigt. **E** Verdauungszone nach dem Entfernen der Drüse. **F** Die Drüse wird über die Pinzette in das PCR-Gefäß abgelegt. Für die Präparation wurde der UV-Filter Lumar 01 (Zeiss) verwendet. Die Präparation wurde von Dr. Ute Müller (aura optik GmbH) durchgeführt. (Bild A-C, E & F: Rottloff *et al.*, 2009)

### 3.3.3 Applikationen des Mikropreparationsverfahrens

#### PCR von Drüsen aus der Verdauungszone von *Nepenthes*-Kannen

Während der Präparation wurden zwei bis fünf Drüsen in ein PCR-Gefäß mit 10 µl ddH<sub>2</sub>O überführt. Anschließend wurde versucht die *NgTLP*- und *NrChit1*-Sequenzen in einer PCR-Reaktion (95 °C 3 min; 30 Zyklen: 95 °C 30 s, 59 °C (*NgTLP*) bzw. 60 °C (*NrChit1*) 30 s, 72 °C 60 s; 72 °C 10 min) direkt von den Drüsen zu amplifizieren, ohne vorherige Extraktion der gDNA.



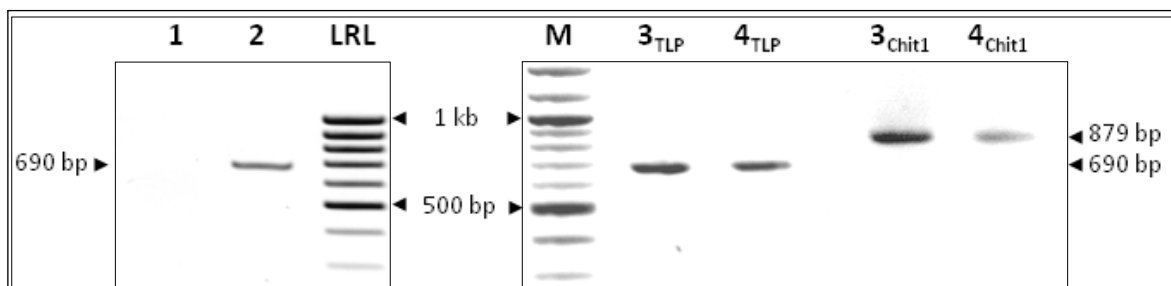
**Abbildung 3.19 Amplifizierung der *NgTLP*- und *NrChit1*-Sequenzen direkt von den Drüsen.**

**A** *NgTLP* konnte aus jeweils zwei Drüsen von sieben verschiedenen *Nepenthes*-Arten amplifiziert werden. (LRL: Low-range DNA Ladder (Fermentas), 1 *N. thorelii*, 2 *N. superba*, 3 *N. gracilis*, 4 *N. fusca*, 5 *N. ampullaria*, 6 *N. mirabilis*, 7 *N. ventricosa*). **B** Auch das *NrChit1*-PCR-Produkt lässt sich nachweisen. Hier gezeigt an einer PCR-Reaktion von fünf Drüsen aus *N. mirabilis*. Die gleiche Anzahl an *N. mirabilis*-Drüsen wurde für die Amplifizierung von *NgTLP* verwendet. (M 100 bp DNA Ladder (NEB)). Die Pfeile kennzeichnen das jeweilige PCR-Produkt: *NgTLP* bei 690 bp (rot) und *NrChit1* bei 879 bp (grün). (Abbildung A: Rottloff *et al.*, 2009)

Für *NgTLP* wurden die Primer Tlp\_sense und Tlp\_antisense, für *NrChit1* EChit\_sense und EChit\_antisense verwendet. In allen getesteten Arten konnte die *NgTLP*-Sequenz direkt von den Drüsen amplifiziert werden (Abb. 3.19, A). Auch das *NrChit1*-Produkt konnte aus gDNA von mehreren *Nepenthes*-Arten nachgewiesen werden und ist hier nur beispielhaft an *N. mirabilis* in Abbildung 3.19 (B) gezeigt. Interessanterweise zeigten die Produkte aus beiden PCR-Reaktionen mit gDNA die gleiche Größe, wie die Amplikons aus cDNA. Dies kann bedeuten, dass weder das *NgTLP*- noch das *NrChit1*-Gen in der kodierenden Region Introns besitzt.

### Optimierung der RNA-Extraktion aus kleinen Gewebemengen

Um RNA aus kleinen Gewebemengen zu isolieren, wurden die Dynabeads® gewählt, da diese den Vorteil haben, mRNA direkt an den Oligo(dT)<sub>25</sub>-Überhang zu binden. Damit sollten sich störende Nukleinsäuren, wie z.B. ribosomale RNA und gDNA, entfernen lassen. Der Zellaufbruch erfolgte über Hitze. Anschließend wurden die Dynabeads® zugegeben und die Proben nach Herstellerprotokoll behandelt. Danach wurde über PCR geprüft, ob die Proben frei von gDNA sind. Die an den Oligo(dT)<sub>25</sub>-Überhang-gebundene RNA kann der DNA-Polymerase nicht als Template dienen und somit würde im Agarose-Gel keine Bande auftreten. Dies ließ sich allerdings nicht bestätigen. Deswegen wurde ein DNase-Verdau an den Dynabeads® durchgeführt und anschließend wiederum über eine PCR-Reaktion überprüft, ob der gDNA-Verdau erfolgreich war. Dieser Vorgang musste zwei- bis dreimal wiederholt werden, bis sich keine gDNA mehr im Ansatz befand. Dann erfolgte eine RT-PCR der Probe. In Abbildung 3.20 ist eine PCR-Reaktion vor und nach der reversen Transkription dargestellt (Probe 1 & 2), in welcher die *NgTLP*-Sequenz amplifiziert wurde. Außerdem wurde derselbe Vorgang mit dem die Drüsen umgebenden epidermalen Gewebe durchgeführt. Auch hier konnte das *NgTLP*-, sowie auch das *NrChit1*-Transkript nachgewiesen werden (Probe 4), obwohl die sekretorischen Zellen der Drüsen als Produzenten der Verdauungsproteine gelten. Allerdings scheint die Produktmenge der Endochitinase-mRNA in den Drüsen höher zu sein als im epidermalen Gewebe, während die des TLPs in Drüsen und dem umgebenden Gewebe gleich zu sein scheint (Probe 3 & 4). Da die Reaktionen nicht quantitativ sind, sollte dies weiter durch *Real-time* PCR überprüft werden.



**Abbildung 3.20 PCR nach Isolierung von mRNA aus Drüsen und epidermalem Gewebe mit Dynabeads®.**

Die mRNA wurde aus Geweben einer Kanne von *N. singalana* isoliert. **1** Kontrolle auf gDNA einer mRNA-Präparation aus Drüsen. **2** PCR-Produkt von cDNA nach RT-PCR von Nr. 1. **3** PCR zur Amplifizierung der TLP- bzw. Chit1-Sequenz von cDNA aus Drüsen. **4** PCR zur Amplifizierung der TLP- bzw. Chit1-Sequenz von cDNA aus epidermalem Gewebe. **LRL** Low-range DNA Ladder (Fermentas). **M** 100 bp DNA Ladder (NEB).

Diese Methode der mRNA-Isolierung wäre z.B. für das Erstellen einer cDNA-Bibliothek gut geeignet, nicht aber für Transkriptanalysen, wie z.B. *Real-time* PCR. Hier besteht die Möglichkeit, dass durch die zahlreichen PCR-Reaktionen und Waschschriffe der an die Dynabeads®-gebundenen mRNA diese verloren geht und das Ergebnis verfälschen würde. Deswegen wurde nach einer weiteren Methode der RNA-Extraktion gesucht. Dabei fand der RNAqueous®-Micro Kit (Ambion) Verwendung. Dieser hat den Vorteil, dass nach der Isolierung der Gesamt-RNA, der DNA-Verdau in Lösung stattfindet und das Enzym mit dem *DNase Inactivation Reagent* gestoppt und aus der Probe entfernt werden kann. Danach kann der RNA- bzw. nach RT-PCR der cDNA-Gehalt ermittelt und eingestellt werden. Beispielsweise konnten so aus 50 Drüsen einer *N. mirabilis*-Kanne etwa 2 µg Gesamt-RNA isoliert werden.

### 3.4 Die *NgTLP*- und *NrChit1*-Sequenzen verschiedener *Nepenthes*-Arten

Wie in Abschnitt 3.3.3 gezeigt werden konnte, ist es möglich unter Verwendung derselben Primerpaare die *NgTLP*- und die *NrChit1*-Sequenzen auch aus gDNA anderer *Nepenthes*-Arten zu amplifizieren. Demzufolge sollten diese Gene in Nepenthaceae stark konserviert sein. Um dies zu überprüfen, wurden die Produkte der PCR-Reaktionen aus den Drüsen und aus von Kannen extrahierter gDNA verwendet, um diese in den pCR®-II blunt-TOPO®-Vektor zu klonieren und zu sequenzieren. Die Sequenzen beider Gene konnten in verschiedenen *Nepenthes*-Arten identifiziert werden und wurden in der online-Datenbank NCBI hinterlegt. Das *NgTLP*-Gen konnte aus *N. ampullaria* (GQ338246), *N. gracilis* (GQ338247), *N. henryana* (GQ338248), *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“ (GQ338249), *N. mirabilis* (GQ338250), *N. rafflesiana* (GQ338251), *N. singalana* (GQ338252) und *N. ventricosa* (GQ338253), und das *NrChit1*-Gen aus *N. ventricosa* (GQ338254), *N. thorelii* (GQ338255), *N. singalana* (GQ338256), *N. rafflesiana* (GQ338257), *N. mirabilis* (GQ338258), *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“ (GQ338259), *N. gracilis* (GQ338260) und *N. ampullaria* (GQ338261) isoliert werden. Um die Ähnlichkeit der Nukleotid- und der korrespondierenden Proteinsequenzen zu überprüfen, wurden diese über Alignments untereinander, sowie mit den TLP- und Endochitinase-Sequenzen anderer Pflanzen-Arten, verglichen. Dafür wurden Sequenzen mit der höchsten Übereinstimmung gewählt. *NgTLP* wurde mit *Actinidia deliciosa* (AJ871175), *Theobroma cacao* (AY766059), *Populus trichocarpa* (XM\_002325041), *Fragaria ananassa* (AF199508), *Helianthus annuus* (AF364864) und *Vitis vinifera* (AF532965), und *NrChit1* mit *Beta vulgaris* (S66038), *Cucurbit sativus* (M24365), *Pyrus pyrifolia* (FJ589785), *Oryza sativa* (AB003195), *Vitis vinifera* (Z68123) und *Lupinus albus* (Y16415), verglichen. Die Ergebnisse der Nukleotid-Analysen sind im Anhang (Abb. 6.3-6), die der Proteine in den Abbildungen 3.21 bis 3.24 dargestellt.

Die TLP-Sequenzen sind konserviert zwischen verschiedenen Pflanzenarten mit einer Übereinstimmung von 68 bis 82 % auf Protein- (Tabelle 3.4a) und 66 bis 74 % auf Nukleotidebene (Tabelle 6.2a). In Nepenthaceae stimmen die Protein- und DNA-Sequenzen z.B. bei *N. ventricosa* und *N. singalana* zu 100 % überein (Tabelle 3.4a). Interessant ist, dass keine der *Nepenthes*-Proteinsequenzen, im Gegensatz zu anderen Pflanzenarten, das vollständige Thaumatin\_1-Motiv zeigt. Allerdings enthalten alle untersuchten Proteine die 16 konservierten Cystein-Reste und die sauren und aromatischen AS, welche die zentrale Spalte umgeben (Abb. 3.21 & 22).

ACU31844	MSQFIKFIVFPSLLLALLSISIDAATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLDPGQTWTINVN	60
ACU31847	MSQFIKFIVFPSLLLALLSISIDAATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLDQGQTWTINVN	60
ACU31843	MSQFIKFIVFPSLLLALLSISIDAATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLDPGQTWTINVN	60
ACU31846	MSQFIKFIVFPSLLLALLSISIDAATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLNPGQTWTINVN	60
ACU31848	MSQFIKFIVFPSLLLALLSISIDAATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLNPGQTWTINVN	60
ACU31845	MSQFIKFIVFPSLLLALLSISIDAATFDIANNCGYTVWAAASPGGGQQLNPGQTWTINVN	60
ACU31849	MSQFIKFIVFPSLLLALLSISIDAATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLDPGQTWSININ	60
ACU31850	MSQFIKFIVFPSLLLALLSISIDAATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLDPGQTWSININ *****.*****:****:***:*	60
ACU31844	AGQTGGRVWARTGCSLSGSNGASCQSGDCGGLLQCQGYGSPNTLAEYSLNQYNNLDFFD	120
ACU31847	AGQTGGRVWARTGCSLSGSNGASCQSGDCGGLLQCQGYGSPNTLAEYSLNQYNNLDFFD	120
ACU31843	AGQTGGRVWARTGCSLSGSNGASCQSGDCGGLLQCQGYGSPNTLAEYSLNQYNNLDFFD	120
ACU31846	AGQTGGRVWARTGCSLSGSNGASCQSGDCGGLLQCQGYGTPNTLAEYSLNQYNNLDFFD	120
ACU31848	AGQTGGRVWARTGCSLSGSNGASCQSGDCGGLLQCQGYGTPPKTLAEYSLNQYNNLDFFD	120
ACU31845	AGQTGGRVWARTGCSLSGSNGASCQSGDCGGLLQCQGYGTPNTLAEYSLNQYNNLDFFD	120
ACU31849	AGQTGGRVWARTGCSLSGSNGASCQSGDCGGLLQCQGYGSPNTLAEYSLNLYNNMDFFD	120
ACU31850	AGQTGGRVWARTGCSLSGSNGASCQSGDCGGLLQCQGYGSPNTLAEYSLNLYNNMDFFD *****.*****:***:***** ***:***	120
ACU31844	MSLVDGFNVPMFSLPTSNGCTNGPTCTADINGQCPSELKAPGGCANNPCTVFKTDEYCCNS	180
ACU31847	MSLVDGFNVPMFVPTSNGCTSGPTCTADINGQCPSVLKAPGGCANNPCTVFKTDEYCCNS	180
ACU31843	MSLVDGFNVPMFSLPTSNGCTNGPTCTADINGQCPSELKAPGGCANNPCTIFKTDEYCCNF	180
ACU31846	MSLVDGFNVPMFSLPTSNGCTNGPTCTADINGQCPSELKAPGGCANNPCTVFKTDEYCCNS	180
ACU31848	MSLVDGFNVPMFSLPTSNGCTNGPTCTADINGQCPSELKAPGGCANNPCTVFKTDEYCCNS	180
ACU31845	MSLVDGFNVPMFSLPTSNGCTNGPTCTADINGQCPSELKAPGGCANNPCTVFKTDEYCCNS	180
ACU31849	MSLVDGFNVPMFSLPTSNGCTNGPTCTVDINGQCPSVLKAPGGCANNPCTVFKTDEYCCNS	180
ACU31850	MSLVDGFNVPMFSLPTSNGCTNGPTCTVDINGQCPSVLKAPGGCANNPCTVFKTDEYCCNS *****:*****.*****.*****.*****.*****:*****	180
ACU31844	GSCSPTSYSEFFKNLCPDAYSYPKDDATSTYTCPGGTNYKVVF	225
ACU31847	GSCSPTSYSEFFKNLCPDAYSYPKDDATSTYTCPGGTNYKVVF	225
ACU31843	GS CGPTSYSEFFKNFCPDAYSYSKDDATSTYTCPGGTNYKVVF	225
ACU31846	GS CGPTSYSEFFKNLCPNAYSYPKDDATSTYTCAGGTNYKVVF	225
ACU31848	GS CGPTSYSEFFKNLCPNAYSYPKDDATSTYTCPGGTNYKVVF	225
ACU31845	GS CGPTSYSEFFKNLCPNAYSYPKDDATSTYTCPGGTNYKVVF	225
ACU31849	GS CGPTSYSEFFKNLCPNAYNYPKDDATSTYTCPGGTNYKVVF	225
ACU31850	GS CGPTSYSEFFKNLCPNAYNYPKDDATSTYTCPGGTNYKVVF ***.***.*****:***:***.***.*****.*****.*****	225

**Abbildung 3.21 Alignment der NgTLP-Proteinsequenzen verschiedener *Nepenthes*-Arten.**

Die Proteinsequenzen sind in den Nepenthaceae stark konserviert und besitzen eine Ähnlichkeit von 93 bis 100 %. Bei allen TLPs ist das Thaumatin\_1-Motiv nur teilweise erhalten geblieben und alle besitzen die 16 Cystein-Reste (fett & rot), sowie die sauren (rot) und aromatischen AS (blau) der zentralen Spalte. *N. gracilis* (ACU31844), *N. mirabilis* (ACU31847), *N. ampullaria* (ACU31843), *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“ (ACU31846), *N. rafflesiana* (ACU31848), *N. henryana* (ACU31845), *N. singalana* (ACU31849) und *N. ventricosa* (ACU31850).

CAI38795	MSTFKSLSLSL-ALLFIAFLFTCARGATFNIINNCPFTVWAAAVPGGGKRLDRGQNWIIINP	59
AAV34889	-----ANGATINIRNNCPYTVWAAAVPGGGRRLDGGVWNLNV	38
XP_002325077	MSRFSYLSLFCFLFAHFFTLNAATFEIRNQCPTVWAAAVPGGGRRLPGESWTITA	60
AAF13707	MSLLKNLPTVLSILYFAAST--VNAATFNKKNNCPFTVWAGAVPGGGKQLGTGTWTINV	58
AAM21199	MTTST-LPTFL-LLAILFHY--TNAAVFTIRNNCPYTVWAGAVPGGGRRQLNSGQTWSLTV	56
AAQ10092	MGLCKILSLIS-SFLLTALFFTPSYAATFNIQNHCSYTVWAAAVPGGGMQLGSGQSWSLNV	59
ACU31844	MSQFIKFIVFPSLLLALLSLIS-IDAATFDIVNNCGYTVWAAASPGGGQQLDGPQTWTINV	59
	.*:.*:****.* ****:*. * * :.	
CAI38795	GAGTKGARVWPRTGCNFDGAGRGCQTGDCNGLLQCQAFGQPPNTLAEYALNQFNNLDF	119
AAV34889	NPGTTGARVWARTKCQFDGAGRGRCEGTDCGGLLQCQAYGAPPNTLAEYALNQFNNKDF	98
XP_002325077	RAGTTQARIWGRTNCFIDGAGRGMCEGTDCNGLLQCQAFGQPPNTLAEYALNQFNNLDF	120
AAF13707	AAGTKGARIWPRTNCNFDGAGRGRCEGTDCGGLLQCQGYGQPPNTLAEYALNQYMNRFY	118
AAM21199	AAGTAGARIWPRTNCNFDGSGRGRCEGTDCNGLLQCQNYGTPPNTLAEYALNQFNNLDF	116
AAQ10092	NAGTTGGRVWARTNCNFDASGNGKCEGTDCGGLLQCTAYGTPPNTLAEFALNQFNNLDF	119
ACU31844	NAGQTGGRVWARTGCSLSGSGNGASCQSGDCGGLLQCQGYGSPNTLAEYSLNQYNNLDF	119
	. * .*: * * * :. . . . *:***.***** :* *****:***: * **:	
CAI38795	DISLVDGFNVAMEFSPTSGGCTRGICCTADINGQCPNELRAPGGCANNPCTVFKTQDYCCN	179
AAV34889	DISLVDGFNVPMDFSPSTSGGCTRGIRCTADIIGQCPNQLKAPGGCANNPCTVFRTQDYCCN	158
XP_002325077	DISLVDGFNVPMDFSPVSGNC-RGIRCAADINGQCPNPLRASGGCANNPCTVFKTQDYCCN	179
AAF13707	DISLIDGFNVPMDFSPVSNCTRGIRCTADINGQCPAQLRAPGGCANNACTVSKTDQDYCCN	178
AAM21199	DISLVDGFNVPMVFRPNNSGCTRGISCTADINGQCPGELRAPGGCANNPCTVYKTQDYCCN	176
AAQ10092	DISLVDGFNVPMFNPSTNGCTRGISCTADIVGCPAALKTTGGCANNPCTVFKTDEYCCN	179
ACU31844	DMSLVDGFNVPMFSLPTSNCTNGPTCTADINGQCPSELKAPGGCANNPCTVFKTDEYCCN	179
	*:***:*****.* * * *. * . * *:*** *:*** *:..*****.*** :*:***	
CAI38795	SGNCGLTNFSKFFKDRCPDAYSYPKDDQTST--FTCPAGTNYKVVF	225
AAV34889	SGNCRPTDFSRFFKTRCPDAYSYPKDDQTST--FTCPGGTNYRVVF	204
XP_002325077	SGSCPTNYSRFFKQRCPCDAYSYPKDDQRTST--FTCPGGTNYRVVF	225
AAF13707	SGHCGPTDYSRFFKSRCPDAYSYPKDDATSTVLFTCPGGTNYRVVF	225
AAM21199	SGNCGPTDLRFFKTRCPDAYSYPKDDPTST--FTCPGGTNYDVIF	222
AAQ10092	SGSCNATDYSRFFKTRCPDAYSYPKDDQTST--FTCPAGTNYEVVF	225
ACU31844	SGSCSPTSYSEFFKNLCPDAYSYPKDDATST--YTCPPGTNYKVVF	225
	** * *. * .*** ***** ** :***.*** *:***	

**Abbildung 3.22 Alignment der NgTLP-Proteinsequenzen verschiedener Pflanzen-Arten.**

Die Sequenzen sind in Pflanzen konserviert und besitzen eine Ähnlichkeit von 68 bis 82 %. Bei allen TLPs außer NgTLP ist das Thaumatin\_1-Motiv vorhanden. Alle besitzen die 16 Cystein-Reste (fett & rot), sowie die sauren (rot) und aromatischen AS (blau) der zentralen Spalte. A. *deliciosa* (CAI38795), T. *cacao* (AAV34889), P. *trichocarpa* (XP\_002325077), F. *ananassa* (AAF13707), H. *annuus* (AAM21199), V. *vinifera* (AAQ10092) und N. *gracilis* (ACU31844).

Die Analyse der Endochitinase-Sequenz ergab ähnliche Ergebnisse. Die Protein- und Nukleotidsequenzen weisen eine Ähnlichkeit von 57 bis 72 % bzw. 55 bis 69 % bei Vergleich verschiedener Pflanzenarten auf und scheinen damit weniger konserviert zu sein als die TLPs. Innerhalb der Nepenthaceae allerdings ist auch die Endochitinase stark konserviert und kann eine Übereinstimmung bis zu 100 % auf Protein- und Nukleotidlevel erreichen (z.B. bei Vergleich von N. *singalana* und N. *gracilis*, Tabelle 3.4b & 6.2b). Alle analysierten Sequenzen weisen das Chitinase\_18-Motiv des aktiven Zentrums auf. Auch sind bei allen Proteinen bis auf die Chitinase von L. *albus*, die 6 konservierten Cystein-Reste enthalten, aber nur wenige haben das Asparagin, welches als potentielle Position für eine N-Glykosylierung ermittelt wurde. Dieses ist auch nur bei drei der acht identifizierten *Nepenthes*-Endochitinasen vorhanden (Abb. 3.23 & 24).



ACU31851	MKTHYSSAILPTLTFLVFLSINPSHGSGIAVYWQNGNEGTLSDT <b>C</b> ATGNYQYVLLSFLT	60
ACU31855	MKTHYSSAILPTLTFLVFLSINPSHGSGIAVYWQNGNEGTLSDT <b>C</b> ATGNYQYVLLSFLT	60
ACU31853	MKTHYSSAILPILTLFVFLSINPSHGSGIAVYWQNGNEGTLSDT <b>C</b> ATGNYNYVLVSFLT	60
ACU31857	MKTHYSSAILPILTLFVFLSINPSHGSGIAVYWQNGNEGTLSDT <b>C</b> ATGNYNYVLVSFLT	60
ACU31856	MKTHYSSAILPIVTLVFLSINPSHGSGIAVYWQNGNEGTLSDT <b>C</b> ATGNYEYVLISFLT	60
ACU31854	MKTHYSSAILPILTLFVFLSINPSHGSGIAVYWQNGNEGTLSDT <b>C</b> ATGNYNYVLVSFLT	60
ACU31858	MKTHYSSAILPILTLFVFLSINPSHGSGIAVYWQNGNEGTLSDT <b>C</b> ATGNYNYVLVSFLT	60
ACU31852	MKTHYSSAILPILTLFVFLSINPSHGSGIAVYWQNGNEGTLSDT <b>C</b> ATGNYNYVLVSFLT	60
***** :*:*****:***:****		
ACU31851	TFGNGQTPVLNLAGH <b>C</b> DPSSNG <b>C</b> TGLSTDITS <b>C</b> QNQGIKVLLSLGGASGSYSLVSTDDAN	120
ACU31855	TFGNGQTPVLNLAGH <b>C</b> DPSSNG <b>C</b> TGLSTDITS <b>C</b> QNQGIKVLLSLGGASGSYSLVSTDDAN	120
ACU31853	TFGNGQTPVLNLAGH <b>C</b> DPSSNG <b>C</b> TGLSTDITS <b>C</b> KNQGIKVLLSLGGASGSYTLVSTDDAN	120
ACU31857	TFGNGQTPVLNLAGH <b>C</b> DPSSNG <b>C</b> TGLSTDITS <b>C</b> KNQGIKVLLSLGGASGSYTLVSTDDAN	120
ACU31856	TFGNGQTPVLNLAGH <b>C</b> DPSSNG <b>C</b> TGLSTDITS <b>C</b> QNQGIKVLLSLGGASGSYSLVSTDDAS	120
ACU31854	TFGNGQTPVLNLAGH <b>C</b> DPSSNG <b>C</b> TGLSTDITS <b>C</b> QNQGIKVLLSLGGASGSYSLVSTDDAD	120
ACU31858	TFGNGQTPVLNLAGH <b>C</b> DPSSNG <b>C</b> TGLSTDITS <b>C</b> QNQGIKVLLSLGGASGSYSLVSTDDAD	120
ACU31852	TFGNGQTPVLNLAGH <b>C</b> DPSSNG <b>C</b> TGLSTDITS <b>C</b> QNQGIKVLLSLGGASGSYSLVSTDDAD	120
*****:*****:*****.		
ACU31851	QVAAYLWNNYLGGQSDSRPLGSAVLGDGIDFDIE <b>S</b> GTDDYWGDLASALKGYQSQSVLVSAAP	180
ACU31855	QVAAYLWNNYLGGQSDSRPLGSAVLGDGIDFDIE <b>S</b> GADDYWGDLASALKGYQSQSVLVSAAP	180
ACU31853	QVAAYLWNNYLGGQSDSRPLGSAVLGDGIDFDIE <b>A</b> GSDDYWGDLASALKGYQSQSVLVSAAP	180
ACU31857	QVAAYLWNNYLGGQSDSRPLGSAVLGDGIDFDIE <b>A</b> GSDDYWGDLASALKGYQSQSVLVSAAP	180
ACU31856	QVATYLWNNYLGGQSDSRPLGSAVLGDGIDFDIE <b>A</b> GSDDYWGDLASALKGYQSQSVLVSAAP	180
ACU31854	QVAAYLWNNYLGGQSDSRPLGSAVLGDGIDFDIE <b>S</b> GSDDYWGDLATALKNYQSQSVLVSAAP	180
ACU31858	QVAAYLWNNYLGGQSDSRPLGSAVLGDGIDFDIE <b>S</b> GSDDYWGDLATALKNYQSQSVLVSAAP	180
ACU31852	QVAAYLWNNYLGGQSDSRPLGSAVLGDGIDFDIE <b>S</b> GSDDYWGDLASALKNYQSQSVLVSAAP	180
***:*****:*.*****		
ACU31851	<b>Q</b> CPYPDAHLDKAIATGIFDYVWVQFYNN <b>Q</b> CEYVNDDTNLLSAWNQWTSSQANVVFLGLP	240
ACU31855	<b>Q</b> CPYPDAHLDKAIATGIFDYVWVQFYNN <b>Q</b> CEYVNDDTNLLSAWNQWTSSQANVVFLGLP	240
ACU31853	<b>Q</b> CPYPDAHLDTAIATGIFDYVWVQFYNN <b>Q</b> CEYVNDDTNLLSAWNQWTSSQANVVFLGLP	240
ACU31857	<b>Q</b> CPYPDAHLDTAIATGIFDYVWVQFYNN <b>Q</b> CEYVNDDTNLLSAWNQWTSSQANVVFLGLP	240
ACU31856	<b>Q</b> CPYPDAHLDTAIATGIFDYVWVQFYNN <b>Q</b> CEYVNDDTNLLSAWNQWTSSQANVVFLGLP	240
ACU31854	<b>Q</b> CPYPDAHLDLAIATGIFDYVWVQFYNN <b>Q</b> CEYVTDNLLSAWNQWTSSQANVVFLGLP	240
ACU31858	<b>Q</b> CPYPDAHLDLAIATGIFDYVWVQFYNN <b>Q</b> CEYVTDNLLSAWNQWTSSQANVVFLGLP	240
ACU31852	<b>Q</b> CPYPDAHLDLAIATGIFDYVWVQFYNN <b>Q</b> CEYVNDDTNLLSAWNQWTSSQANVVFLGLP	240
***** *****:*.*****		
ACU31851	ASTAAANSGYIPPDVLTSQVLPSIKASSKYGGVMLWSKYDNGYSSAIKDSV	292
ACU31855	ASTAAANSGYIPPDVLTSQVLPSIKASSKYGGVMLWSKYDNGYSSAIKDSV	292
ACU31853	ASTDAASSGYIPPDVLISQVLPSIKASSKYGGVMLWSKYDNGYSSAIKDSV	292
ACU31857	ASTDAASSGYIPPDVLISQVLPSIKASSKYGGVMLWSKYDNGYSSAIKDSV	292
ACU31856	ASTDAASSGYIPPDVLISQVLPSIKASSKYGGVMLWSKYDNGYSSAIKDSV	292
ACU31854	ASTDAASSGYISPDVLISQVLPSIKASSKYGGVMLWSKYDNGYSSAIKDSV	292
ACU31858	ASTDAASSGYISPDVLISQVLPSIKASSKYGGVMLWSKYDNGYSSAIKDSV	292
ACU31852	ASTDAASSGYISPDVLISQVLPSIKASSKYGGVMLWSKYDNGYSSAIKDSV	292
*** *.***** *****		

**Abbildung 3.23 Alignment NrChit1-Proteinsequenzen verschiedener *Nepenthes*-Arten.**

Die Proteinsequenzen sind in den Nepenthaceae stark konserviert und besitzen eine Ähnlichkeit von 95 bis 100 %. Bei allen Endochitinasen ist das Chitinase\_18-Motiv, welches das aktive Zentrum darstellt, enthalten und alle besitzen die 6 Cystein-Reste (fett & rot). Allerdings weisen nur drei Sequenzen das Asparagin (rot unterlegt) auf, welches als potentielle Stelle für eine N-Glykosylierung gilt. *N. ventricosa* (ACU31851), *N. mirabilis* (ACU31855), *N. singalana* (ACU31853), *N. gracilis* (ACU31857), *N. rafflesiana* "Mizuho Kondo" (ACU31856), *N. rafflesiana* (ACU31854), *N. ampullaria* (ACU31858) und *N. thorelii* (ACU31852).

Tabellen 3.4a. Ähnlichkeiten (oben) und Unterschiede (unten) der TLP-Proteinsequenzen verschiedener *Nepenthes*- (links) bzw. Pflanzenarten (rechts).

	<i>N. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>N. h.</i>	<i>N. r. MZ</i>	<i>N. m.</i>	<i>N. r.</i>	<i>N. s.</i>	<i>N. v.</i>	
<i>N. a.</i>		96,9	95,1	95,6	95,1	95,6	93,4	93,4	<i>N. a.</i>
<i>N. g.</i>	2,3		97,3	97,8	98,2	97,8	95,6	95,6	<i>N. g.</i>
<i>N. h.</i>	5,0	7,2		98,7	95,6	98,7	94,7	94,7	<i>N. h.</i>
<i>N. r. MZ</i>	6,4	2,2	3,1		96,0	99,1	95,1	95,1	<i>N. r. MZ</i>
<i>N. m.</i>	5,0	8,1	6,4	1,4		96,0	94,7	94,7	<i>N. m.</i>
<i>N. r.</i>	6,4	2,2	3,1	0,9	1,4		95,1	95,1	<i>N. r.</i>
<i>N. s.</i>	7,0	6,4	5,5	5,0	5,5	5,0		100,0	<i>N. s.</i>
<i>N. v.</i>	7,0	6,4	5,5	5,0	5,5	5,0	0,0		<i>N. v.</i>
	<i>N. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>N. h.</i>	<i>N. r. MZ</i>	<i>N. m.</i>	<i>N. r.</i>	<i>N. s.</i>	<i>N. v.</i>	

*N. ampullaria* (*N. a.*), *N. gracilis* (*N. g.*), *N. henryana* (*N. h.*), *N. rafflesiana* "Mizuho Kondo" (*N. r. MZ*), *N. mirabilis* (*N. m.*), *N. rafflesiana* (*N. r.*), *N. singalana* (*N. s.*) und *N. ventricosa* (*N. v.*).

	<i>A. d.</i>	<i>F. a.</i>	<i>H. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>P. t.</i>	<i>T. c.</i>	<i>V. v.</i>	
<i>A. d.</i>		75,1	75,8	68,9	76,9	82,4	72,1	<i>A. d.</i>
<i>F. a.</i>	33,0		78,5	68,0	73,2	79,0	69,8	<i>F. a.</i>
<i>H. a.</i>	32,9	42,5		69,5	74,8	79,5	73,5	<i>H. a.</i>
<i>N. g.</i>	40,1	41,6	39,1		67,1	72,7	69,3	<i>N. g.</i>
<i>P. t.</i>	27,7	33,2	38,0	43,2		80,9	72,4	<i>P. t.</i>
<i>T. c.</i>	21,0	42,7	24,0	34,0	22,1		78,0	<i>T. c.</i>
<i>V. v.</i>	34,9	38,6	32,7	39,4	34,4	26,0		<i>V. v.</i>
	<i>A. d.</i>	<i>F. a.</i>	<i>H. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>P. t.</i>	<i>T. c.</i>	<i>V. v.</i>	

*A. deliciosa* (*A. d.*), *F. ananassa* (*F. a.*), *H. annuus* (*H. a.*), *N. gracilis* (*N. g.*), *P. trichocarpa* (*P. t.*), *T. cacao* (*T. c.*) und *V. vinifera* (*V. v.*).

Tabellen 3.4b. Ähnlichkeiten (oben) und Unterschiede (unten) der Endochitinase-Proteinsequenzen verschiedener *Nepenthes*- (links) bzw. Pflanzenarten (rechts).

	<i>N. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>N. r. MZ</i>	<i>N. m.</i>	<i>N. r.</i>	<i>N. s.</i>	<i>N. t.</i>	<i>N. v.</i>	
<i>N. a.</i>		96,2	95,2	94,9	99,7	96,2	99,0	94,9	<i>N. a.</i>
<i>N. g.</i>	9,3		97,3	96,2	96,6	100,0	97,3	96,2	<i>N. g.</i>
<i>N. r. MZ</i>	5,0	8,2		95,5	95,5	97,3	96,2	95,5	<i>N. r. MZ</i>
<i>N. m.</i>	3,5	9,3	6,4		95,2	96,2	95,9	99,7	<i>N. m.</i>
<i>N. r.</i>	0,3	5,3	6,4	5,0		96,6	99,3	95,2	<i>N. r.</i>
<i>N. s.</i>	9,3	0,0	8,2	9,3	5,3		97,3	96,2	<i>N. s.</i>
<i>N. t.</i>	1,0	8,2	9,3	2,4	0,7	8,2		95,9	<i>N. t.</i>
<i>N. v.</i>	3,5	9,3	6,4	0,3	5,0	9,3	2,4		<i>N. v.</i>
	<i>N. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>N. r. MZ</i>	<i>N. m.</i>	<i>N. r.</i>	<i>N. s.</i>	<i>N. t.</i>	<i>N. v.</i>	

*N. ampullaria* (*N. a.*), *N. gracilis* (*N. g.*), *N. rafflesiana* "Mizuho Kondo" (*N. r. MZ*), *N. mirabilis* (*N. m.*), *N. rafflesiana* (*N. r.*), *N. singalana* (*N. s.*), *N. thorelii* (*N. t.*) und *N. ventricosa* (*N. v.*).

	<i>B. v.</i>	<i>C. s.</i>	<i>L. a.</i>	<i>N. r.</i>	<i>O. s.</i>	<i>P. p.</i>	<i>V. v.</i>	
<i>B. v.</i>		62,3	66,0	66,0	60,5	69,7	65,3	<i>B. v.</i>
<i>C. s.</i>	52,0		63,3	62,9	57,4	66,0	60,3	<i>C. s.</i>
<i>L. a.</i>	45,2	50,1		63,1	58,7	72,3	64,9	<i>L. a.</i>
<i>N. r.</i>	45,2	50,9	50,5		62,1	62,8	61,6	<i>N. r.</i>
<i>O. s.</i>	55,5	62,1	59,3	52,3		60,2	62,8	<i>O. s.</i>
<i>P. p.</i>	38,7	45,2	34,6	51,0	56,2		64,4	<i>P. p.</i>
<i>V. v.</i>	46,4	55,9	47,0	53,3	51,0	48,0		<i>V. v.</i>
	<i>B. v.</i>	<i>C. s.</i>	<i>L. a.</i>	<i>N. r.</i>	<i>O. s.</i>	<i>P. p.</i>	<i>V. v.</i>	

*B. vulgaris* (*B. v.*), *C. sativus* (*C. s.*), *L. albus* (*L. a.*), *N. rafflesiana* (*N. r.*), *O. sativa* (*O. s.*), *P. pyrifolia* (*P. p.*) und *V. vinifera* (*V. v.*).



ACM45715	MASKTQTLALTLSSLILISS-CKSSQAAG-IAIYWGQNGNEGLADA	CNSGNYQFVNIAF	58
CAA76203	MASLKQVSLILFPLLLLISSSFKLSNAAG-IVIYWGQNGNEGLADA	CNTNNYQYVNIAF	59
AAA33120	MAAHKIT--TTLISIFLLSSIFRSSDAAG-IAIYWGQNGNEGLAST	CATGNYEFVNIAF	57
ACU31854	MKTHYSSAILPILTLFVFLS-INPSHGSQ-IAVYWGQNGNEGLSDT	CATGNYNYVLVSF	58
AAB28479	MAAKIVS--VLFLISLLIFASFESSHGSQ-IVIYWGQNGDEGLADT	CNSGNYGTVILAF	57
CAA92207	MARTPQS--TPLLISLSVLALLQTSYAGG-IAIYWGQNGNEGLTQT	CNTGKYSYVNIAF	57
BAA22266	MTSRMFSAMQMLIMVVVALAGLAAGTRAGDIAIYWGQNGNEGLAQT	CATGNRYRFVIVAF	60
	* : . : . . *:*****:***::* :.:* * :.*		
ACM45715	LITFGNNQTPVLNLAGHCDPASGTCTGLSADIRT	CQSKNIKVLLSIGGASGSYSLTSADD	118
CAA76203	LSTFGNGQTPVLNLAGHSR-----DGLNADIKG	CQKGKIKVLLSLGGGAGSYSLNSADD	113
AAA33120	LSSFSGSQAPVLNLAGHCNPDNNGCAFLSDEINS	CKSQNVKVLSSIGGGAGSYSLSSADD	117
ACU31854	LTTFGNGQTPVLNLAGHCDPSSNGCTGLSTDITS	CQNQGIKVLSSIGGASGSYSLVSTDD	118
AAB28479	VATFGNGQTPALNLAGHCDPATN-CNSLSSDIKT	CQQAGIKVLLSIGGGAGGSYSLSTDD	116
CAA92207	LNKFGNGQTPVLNLAGHCNPASNGCTSVSTGIRN	CQNRGIKVMLSIGGGAGSYSLSSND	117
BAA22266	LPVFGKGQTPVLNLAGHCDPASNGCTGVGADIKS	CQSLGIKVMFSIGGGVGVNYGLSSRDD	120
	: *.**.*:*****. :. * *: :.***:***. *.**.* :.*		
ACM45715	ARQVADYIWNFLGGQSASRPLGDAVL	DGVDGDFDIEAGGGQFYDELARSLNHNGQA---K	175
CAA76203	ATNLANYLWNNFLGGTSDSRPFGDAVL	DGIDGDFDIEAGGAQHYDELARALNGFSSQK---K	170
AAA33120	AKQVANFIWNSYLGGSQDSRPLGA	AVLDGVDGDFDIESGSGQFWDVLAQELK	170
ACU31854	ADQVAAYLWNNYLGGSQDSRPLGSA	VLGIDGDFDIESGSDNYWGLDATALK	172
AAB28479	ANTFADYLWNTYLGGSSTRPLGDAVL	DGIDGDFDIESGDGFEWDDLARALAGHNGQ---K	173
CAA92207	AQNVANYLWNNFLGGQSSSRPLGDAVL	DGIDGDFDIELGSTLHWDDLARALSRIEFQQERGR	177
BAA22266	AKQVAAYLWNNYLGGSQSPSRPLGDAV	MDGIDGDFDIESGGMYWDDLARYLKAYS	180
	* . * :.***:*** * :***:***:*** * . :. ** *		
ACM45715	TVYLAAPQCP	IPDAHLDAIQTGLFDYVWVQFYNNPPCQYADG-NANALLNSWSQWAS-	233
CAA76203	-VYLGAAPQCP	IPDAHLDAIQTGLFDYVWVQFYNNPPCQYACG-NTNNLINSWNQWTS-	227
AAA33120	QVILSAAPQCP	IPDAHLDAIQTGLFDYVWVQFYNNPPCMFAD--NADNLLSSWNQWTA-	227
ACU31854	SVLVSAAPQCP	YPDAHLDAIATGIFDYVWVQFYNNPPCEYVT--DDTNLLSAWNQWTS-	229
AAB28479	TVYLSAAPQCP	PLDASLTAIATGIFDYVWVQFYNNPPCQYDT--SADNLLSSWNQWTT-	230
CAA92207	KVYLTAAPQCP	FPDKVPGTALNTGLFDYVWVQFYNNPPCQYSSG-NTNNLINSWNRTSS	236
BAA22266	PVYLTAAPQCP	FPDASLGVALSTGLFDYVWVQFYNNPPCQYSSSNGVGNLASAWKQWTS-	239
	* : ***** ** . *: **:*** ***** * : . * :.*:***:		
ACM45715	VPATQVFMGLPASTDAAGSG-FIPADALKS	QVLPTIKNSAKYGGVMLWSRWYDINSGYSA	292
CAA76203	SQAKQVFLGLPASEAAAPSGGFIP	TDVLISQVLPTIKTSPKYGGVMLWNGFNDIQTGYSD	287
AAA33120	FPTSKLYMGLPAAREAAPSGGFIP	ADVLISQVLPTIKASSNYGGVMLWS--KAFDNGYS	285
ACU31854	SQANVFLGLPASTDAASSG-YISP	DVLISQVLPSIKASSKYGGVMLWS--KYDNGYSS	286
AAB28479	VQANQIFLGLPASTDAAGSG-FIP	DALTSQVLPTIKGSAKYGGVMLWS--KAYDSGYSS	287
CAA92207	INSTGSFMGLPASSAAAGRG-FIP	ANVLTSQILPVIKRSPKYGGVMLWSKYDDQSGYSS	295
BAA22266	IPAGRVFLGLPVAAEAAGSG-FV	ETSDLVSKVLPVVKSPKYGGIMLWSRYDDGLTGYSD	298
	: :.***: ** * :. . * *:*** : * *:***:***. .***		
ACM45715	SIKDSI-		298
CAA76203	AIKASV-		293
AAA33120	SIKGSIG		292
ACU31854	AIKDSV-		292
AAB28479	AIKSSV-		293
CAA92207	SIKSSV-		301
BAA22266	KVKSSV-		304
	:* *:		

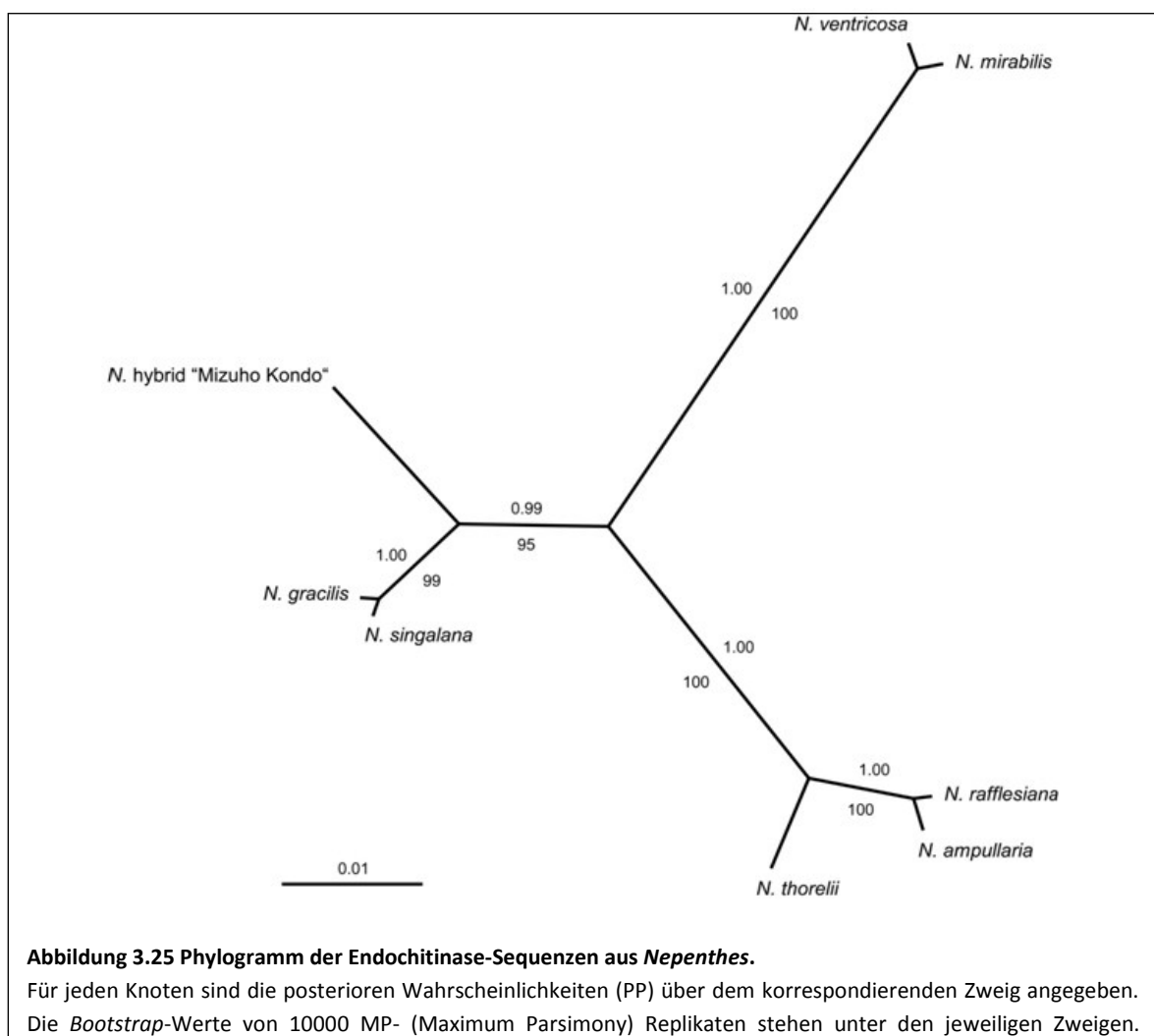
**Abbildung 3.24 Alignment von Endochitinase-Proteinsequenzen verschiedener Pflanzen-Arten.**

Die Endochitinase-Sequenzen sind in Pflanzen konserviert und besitzen eine Ähnlichkeit von 57 bis 72 %. Bei allen Endochitinasen ist das Chitinase<sub>18</sub>-Motiv, welches das aktive Zentrum darstellt, enthalten. Aber nicht alle besitzen die 6 Cystein-Reste (fett & rot) und nur zwei Sequenzen weisen das Asparagin (rot unterlegt) auf, welches als potentielle Stelle für eine N-Glykosylierung gilt. *P. pyrifolia* (ACM45715), *L. albus* (CAA76203), *C. sativus* (AAA33120), *N. rafflesiana* (ACU31854), *B. vulgaris* (AAB28479), *V. vinifera* (CAA92207) und *O. sativa* (BAA22266).

Interessanterweise sind die kodierenden Regionen beider Gene bei allen untersuchten *Nepenthes*-Arten frei von Introns, was sich über die Größe der PCR-Produkte (Abb. 3.19) schon vermuten ließ. Bei den TLP-Sequenzen der anderen Pflanzenarten wurden neben mRNA- auch

Gensequenzen (*F. ananassa*, *T. cacao* und *P. trichocarpa*) verwendet. Auch diese weisen keine Introns im kodierenden Bereich der Gene auf (Abb. 6.4). Für die Chitinasen aus anderen Pflanzen wurden nur mRNA-Sequenzen verwendet (Abb. 6.6). Allerdings zeigten weitere Datenbank-Analysen, dass bisher identifizierte Chitinase-Gene der Klasse III ebenfalls keine Introns in der kodierenden Region besitzen, z.B. Chit1-Gen von *Malus domestica* (AF309514), *Medicago truncatula* (AY238969) und *Vitis vinifera* (AB105374).

Um die Verwandtschaft der *Nepenthes*-Gene besser darzustellen, wurde eine phylogenetische Berechnung am Beispiel der Endochitinase durch Florian Turini (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Heubl, Ludwig-Maximilians-Universität, München) vorgenommen. Die Maximum-Parsimony-Methode resultierte in einem Phylogramm mit einer Länge von 78 Schritten und einem Konsistenz-, sowie Retentions-Index von 0,95. Die Topologie des *bootstrap* 50 % *majority rule consensus tree*, mit identischen Werten, korrespondierte mit der Topologie des *Bayesian consensus tree*, der sich aus 1.000.000 Generationen ergab. Dies ist in Abbildung 3.25 inklusive der *Bayesian* posterioren Wahrscheinlichkeiten (*posterior probabilities*, PP) und der *Bootstrap support*- (BS) Werte der Parsimony-Analyse dargestellt.



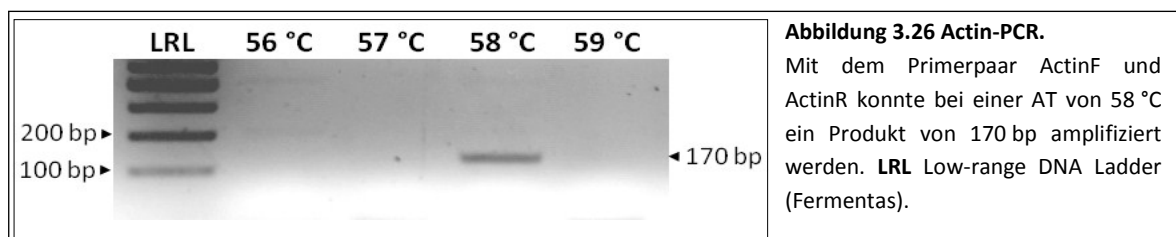
Die Topologie zeigt drei Hauptlinien mit hohem statistischem Support. Eine Linie enthält *N. ventricosa* und *N. mirabilis* (PP, 1.00; BS, 100). Die Zweite besteht aus *N. thorelii* (PP, 1.00; BS, 100) und, als Schwestergruppe, eine Monophylie bestehend aus *N. rafflesiana* und *N. ampullaria* (PP, 1.00; BS, 100). Die dritte Linie wird von *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“, des Schwestertaxons der Monophylie, gebildet von *N. gracilis* und *N. singalana* (PP, 0.99; BS, 99), vertreten (Rottloff *et al.*, 2011).

### 3.5 Transkript-Analysen

#### 3.5.1 Real-time PCR

##### Identifizierung möglicher Referenzgene

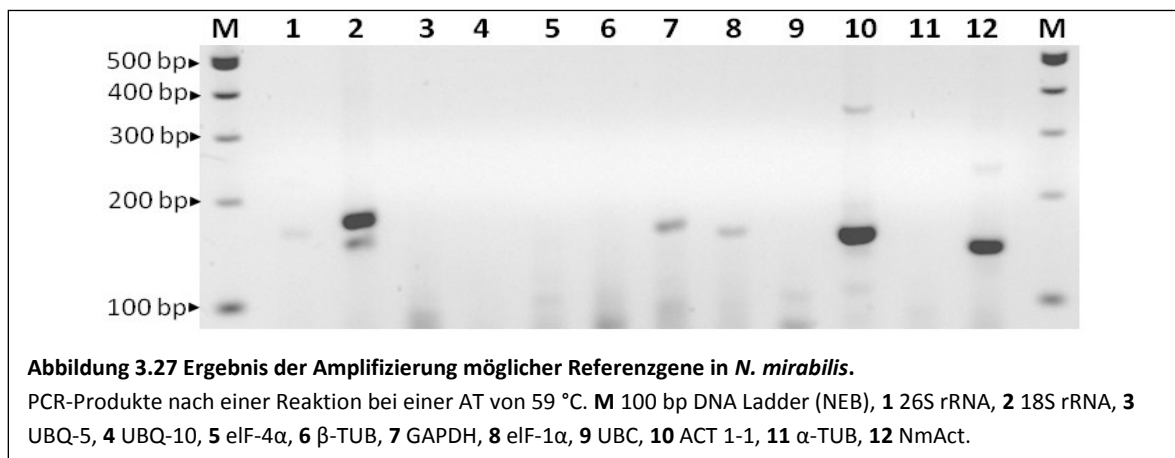
Um gute Ergebnisse in der *Real-time* PCR zu erhalten, ist es wichtig ein Referenzgen zu wählen, dessen Expression konstant ist und nicht durch eine mögliche Behandlung beeinflusst werden kann. Häufig wird dafür Actin verwendet. Da es für *Nepenthes* nur sehr wenige Sequenz-Informationen gibt und die meisten sich auf Proteine des Verdauungssekrets beschränken, wurde nach Actin-Sequenzen gesucht, die in mehreren Pflanzenarten konserviert sind. Van den Berg *et al.* (2004) nutzten Actin als Kontrolle für ein PCR-basierendes Screening über *Microarrays* einer cDNA-Bibliothek um Gene von Perlhirse (*Pennisetum glaucum*) und Banane (*Musa acuminata*) zu identifizieren. Die dafür verwendeten Primer (ActinF & ActinR) wurden hier genutzt um ein Actin-cDNA-Fragment aus *Nepenthes* zu amplifizieren. Dafür wurde ein PCR-Programm mit Gradienten genutzt (95 °C 2 min; 30 Zyklen: 95 °C 30 s, 56/57/58/59 °C 30 s, 72 °C 60 s; 72 °C 10 min) um verschiedene *Annealing*-Temperaturen (AT) zu testen. Als Template diente eine cDNA-Probe, die aus mRNA einer *N. mirabilis*-Kanne gewonnen wurde. Die Reaktion ergab ein Produkt von 170 bp bei einer AT von 58 °C (Abb. 3.26), welches der Größe des Actin-Fragments aus Banane entspricht.



Um zu prüfen, ob es sich wirklich um ein Actin-Fragment handelt, wurde das PCR-Produkt in den pCR®-Blunt II-TOPO®-Vektor kloniert und das resultierende Plasmid pNmAc sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde in der NCBI-Datenbank analysiert, wobei sich bestätigte, dass es sich beim PCR-Produkt um Actin (*NmAct*) handelt.

Um eine höhere Genauigkeit in der *Real-time* PCR zu erzielen, ist es besser mehrere Referenzgene zu verwenden. Deshalb wurden weitere Sequenzen gesucht. In der Literatur wurden neben Actin gute Ergebnisse mit 18S und 26S rRNA, Ubiquitin 5 und 10 (UBQ), dem Ubiquitin-konjugierenden

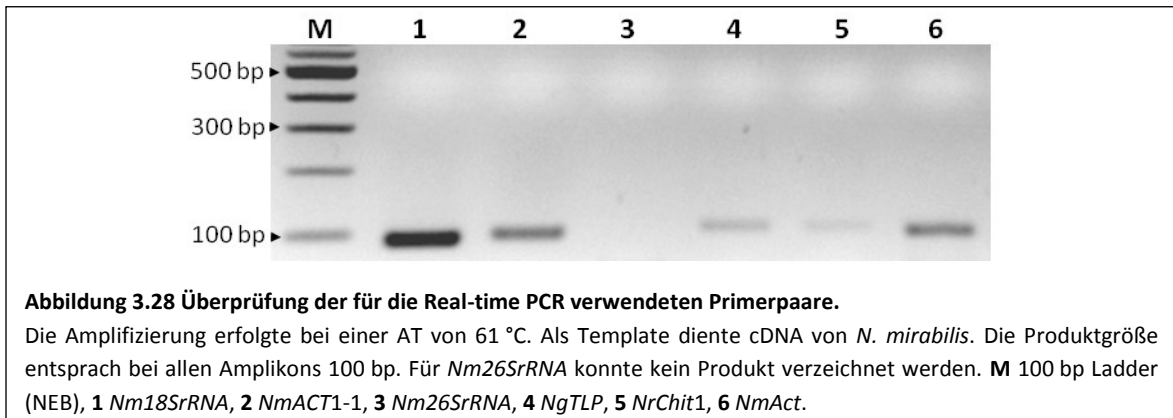
Enzym E2 (UBC),  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (TUB), Elongationsfaktor (eIF) 1- und 4- $\alpha$  und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) erzielt. Jain *et al.* (2006) testeten diese Referenzgene in Reis (*Oryza sativa*). Von den verwendeten Sequenzen wurden Datenbank-Analysen durchgeführt um in verschiedenen Pflanzenarten konservierte Bereiche zu finden. Für diese Sequenzfragmente wurden mit der Primer3Plus Software Oligonukleotide hergestellt (Tabelle 2.4b & c). Anschließend wurden die Primerpaare in einer Gradienten-PCR (95 °C 2 min; 30 Zyklen: 95 °C 30 s, 58/59/60/61 °C 30 s, 72 °C 30 s; 72 °C 10 min) getestet. Als Template diente wiederum cDNA von *N. mirabilis*-Kannen und für die Positivkontrolle wurde *NmAct* verwendet. Die PCR-Produkte wurden in einem 3 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt, wobei aber nur in sechs der zwölf Reaktionen Banden zu sehen waren (Abb. 3.27).



Bei der Amplifizierung der 26S rRNA zeigte sich eine Bande von 170 bp, bei 18S rRNA waren zwei Produkte bei 160 bzw. 180 bp zu sehen. Mit den Primerpaaren für GAPDH und eIF-1 $\alpha$  konnte jeweils ein Amplikon von rund 170 bp, und für ACT 1-1 waren zwei Produkte bei 160 und 380 bp zu sehen. Bei den PCR-Reaktionen der UBQ-5-, UBQ-10-, eIF-4 $\alpha$ -,  $\alpha$ - und  $\beta$ -TUB-Sequenzen konnte allerdings keine Amplifikation verzeichnet werden.

Die Amplikons wurden wiederum in den pCR®-Blunt II TOPO®-Vektor kloniert und anschließend sequenziert um zu überprüfen, ob es sich beim Produkt tatsächlich um die gewünschte Sequenz handelt. Durch die Analyse der Sequenzen in der NCBI-Datenbank konnte für die 18S und 26S rRNA-Fragmente sowie für das ACT 1-1-Amplikon die Identität bestätigt werden. Die Produkte der GAPDH- und eIF-1 $\alpha$ -PCR-Reaktionen waren unspezifisch. Durch weitere Sequenzanalysen stellte sich heraus, dass *NmAct* und ACT 1-1 unterschiedliche Fragmente der gleichen Actin-mRNA darstellen. Da die Sequenzen für *NmAct*, *NmACT1-1*, *Nm18SrRNA* und *Nm26SrRNA* noch nicht auf einer Datenbank hinterlegt wurden, sind diese im Anhang (Abb. 6.7) angegeben.

Für die Referenzgene sowie *NgTLP* und *NrChit1* wurden neue Primerpaare mit annähernd gleicher Schmelztemperatur hergestellt, mit denen jeweils 100 bp-lange Fragmente amplifiziert werden können. Dabei wurde jeweils ein Primerpaar für jedes Actin-Fragment entwickelt. Da in einem Vorversuch zum Teil Doppelbanden auftraten, wurden die PCR-Bedingungen (94 °C 2 min; 25 Zyklen: 94 °C 15 s, 61 °C 30 s, 72 °C 30 s; 72 °C 10 min) sowie die Konzentrationen der Reagenzien angepasst. Allerdings konnte für *Nm26SrRNA* kein Amplikon verzeichnet werden (Abb. 3.28).

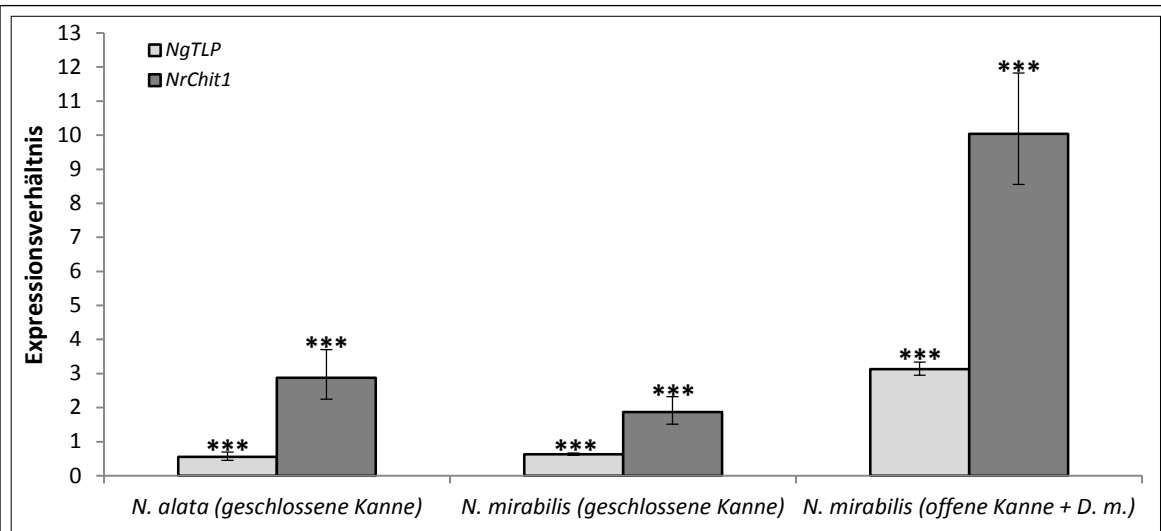


Deshalb wurden die 26SrRNA-Oligonukleotide verworfen und die restlichen Primerpaare in einer *Real-time* PCR getestet. Nachdem in der *non-template*-Kontrolle der für das ACT 1-1-Fragment verwendeten Oligonukleotide Primer-Dimere auftraten, wurden auch diese verworfen. Alle für die *Real-time* PCR verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 2.4c aufgelistet.

#### Untersuchung der NgTLP- und NrChit1-Expression im Kannengewebe

Bisher wurde geglaubt, dass die Drüsen die Produzenten der Verdauungsproteine sind. In Abschnitt 3.3.3 konnte gezeigt werden, dass NgTLP und NrChit1 auch im epidermalen Gewebe exprimiert werden, welches die Drüsen umgibt. Nun wäre es interessant aufzuklären, in welchen der beiden Gewebearten eine höhere Expression der Proteine stattfindet. Deshalb wurden die Drüsen und das epidermale Gewebe von jeweils einer geschlossenen Kanne von *N. alata* und *N. mirabilis* sowie einer mit Fruchtfliegen (*D. melanogaster*) gefütterten, offenen *N. mirabilis*-Kanne isoliert und die Gesamt-RNA extrahiert. Von allen Proben wurden 75 ng cDNA in Triplikaten für die *Real-time* PCR verwendet. Die Berechnung der Expressionsverhältnisse erfolgte mit der REST© Software unter der Verwendung der Referenzgene *NmAct* und *Nm18SrRNA*. Dabei wurden die Drüsen als Kontroll- und das epidermale Gewebe als Probengruppe definiert. Die statistische Analyse erfolgte ebenfalls mit der REST©-Software. Diese erfolgt über einen Hypothesentest  $P(H1)$ . Dabei werden signifikante Unterschiede ( $P(H1) < 0,001$ ) zwischen Proben- und Kontrollgruppe unter Beachtung der PCR-Effizienz und der Normalisierung der Referenzgene festgestellt.

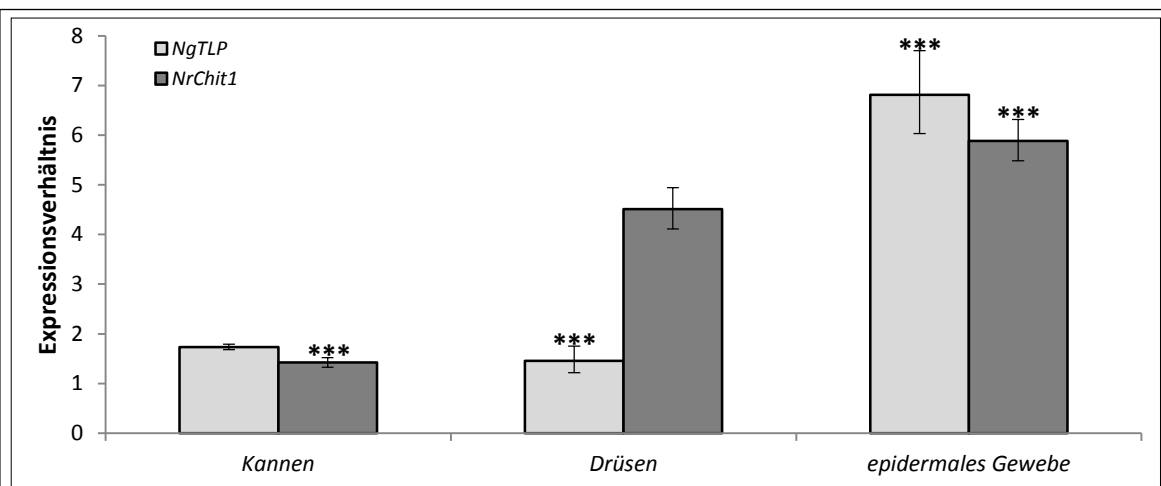
Die Auswertung der Expressionsverhältnisse ergab ein signifikant höheres Level des Endochitinase-Transkripts im epidermalen Gewebe im Vergleich zu den Drüsen, sowohl in geschlossenen Kannen von *N. alata* (2,88) und *N. mirabilis* (1,87), als auch in den mit Fruchtfliegen gefütterten, offenen *N. mirabilis*-Kannen (10,04). Interessanterweise ist die Menge an TLP-mRNA in den Drüsen von geschlossenen Kannen geringer als im epidermalen Gewebe (*N. alata*: 0,56; *N. mirabilis*: 0,63). Dies verändert sich aber in offenen *N. mirabilis*-Kannen nach der Zugabe von Fruchtfliegen. Hier ist die TLP-Expression im epidermalen Gewebe dreimal höher als in den Drüsen (Abb. 3.29). Die *NgTLP*- und *NrChit1*-Expressionsverhältnisse waren in geschlossenen Kannen von *N. alata* und *N. mirabilis* ähnlich. Nun sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der Transkriptmenge der zwei *Nepenthes*-Arten gibt.



**Abbildung 3.29 Expression von NgTLP und NrChit1 in Drüsen und epidermalem Gewebe von *Nepenthes*-Kannen.**

Das NgTLP- und NrChit1-Expressionlevel wurde an verschiedenen Geweben von jeweils einer geschlossenen Kanne von *N. mirabilis* und *N. alata*, sowie einer mit *D. melanogaster* (*D. m.*) gefütterten, offenen *N. mirabilis*-Kanne getestet. Dabei wurden die Drüsen als Kontroll- und das epidermale Gewebe als Probengruppe definiert. Die experimentelle und statistische Auswertung erfolgte mit REST©. Eine signifikante Änderung ( $P(H1) < 0,001$ ) des Expressionslevels ist mit \*\*\* gekennzeichnet.

Dazu wurden ebenfalls geschlossene Kannen verwendet und deren Gesamt-RNA in der *Real-time* PCR eingesetzt. Außerdem wurden Drüsen und epidermales Gewebe präpariert und getestet. Für jede Reaktion wurden 30 ng cDNA verwendet. Die Messung erfolgte gegen die Referenzgene *NmAct* und *Nm18SrRNA*. Die experimentelle und statistische Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. *N. mirabilis* wurde als Kontroll- und *N. alata* als Probengruppe definiert.

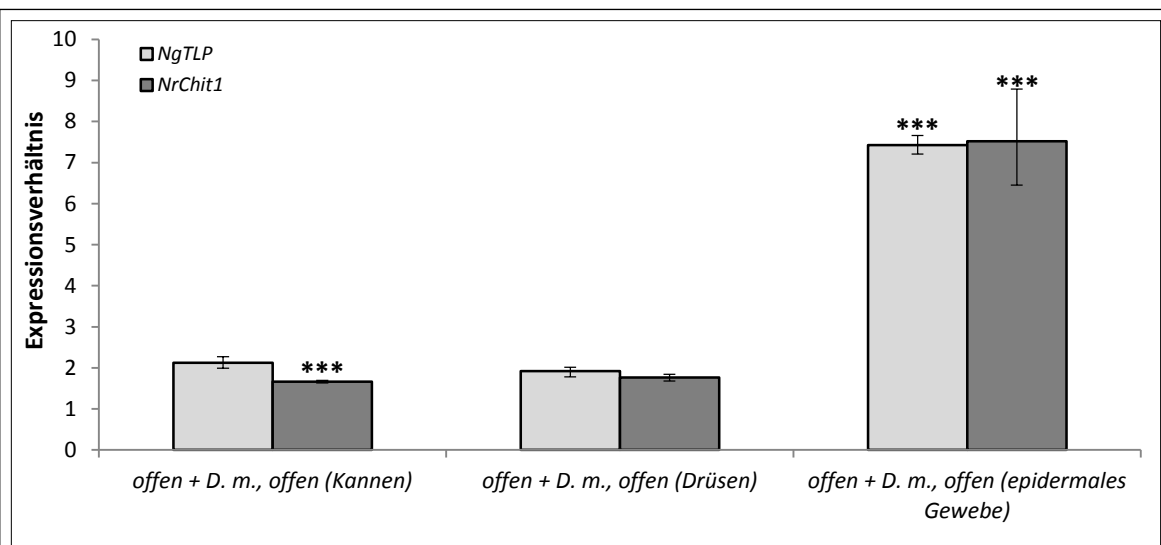


**Abbildung 3.30 Expression von NgTLP und NrChit1 in *N. mirabilis* und *N. alata*-Kannen.**

Die NgTLP- und NrChit1-Expression von geschlossenen *N. mirabilis*- (Kontrolle) und *N. alata*-(Probe) Kannen wurde miteinander verglichen. Die Bestimmung erfolgte an ganzen Kannen, sowie an einzelnen Gewebearten (Drüsen & epidermales Gewebe). Die experimentelle und statistische Auswertung erfolgte mit REST©. Signifikante Veränderung ( $P(H1) < 0,001$ ) in der Expression sind mit \*\*\* gekennzeichnet.

Alle getesteten Gewebearten zeigten eine höhere Expression von *NgTLP*- und *NrChit1* in *N. alata*. Diese waren allerdings nur im epidermalen Gewebe signifikant (*NgTLP*: 6,82; *NrChit1*: 5,89). In *N. alata*-Drüsen ist die Menge beider Transkripte größer (*NgTLP*: 1,46; *NrChit1*: 4,51), jedoch nur für *NgTLP* war dieser Unterschied signifikant. Ähnlich verhält es sich beim Vergleich ganzer Kannen. Hier liegt die doppelte Menge an *NgTLP*- und *NrChit1*-mRNA in *N. alata* vor, wobei der Wert nur für *NgTLP* signifikant ist (Abb. 3.30).

Für *N. khasiana* wurde bereits beschrieben, dass die chitinolytische Aktivität nach Zugabe von Chitin ansteigt (Eilenberg *et al.*, 2006). Dies führt zu der Annahme, dass die Expression und Sekretion einiger Chitinasen der Kannenflüssigkeit induzierbar sind. Die Funktion des TLPs in der Kannenflüssigkeit ist noch unbekannt. Dennoch könnte auch die Expression dieses Proteins induzierbar sein. Deshalb wurden Proteine in einer *Real-time* PCR auf ihre Induzierbarkeit geprüft. Dies erfolgte anhand der mRNA zweier offener *N. mirabilis*-Kannen. Beide Kannen wurden zum gleichen Zeitpunkt von der Pflanze gebildet. Nach Öffnung der Kannen, wurde eine davon mit 30 Fruchtfliegen gefüttert. Anschließend wurden beide Kannen durch einen Feinstrumpf verschlossen, um eine Kontamination durch andere Insekten zu vermeiden. Die Kannen wurden nach sieben Tagen geerntet, die RNA ganzer Kannen sowie von Drüsen und epidermalem Gewebe isoliert und 30 ng cDNA pro Reaktion eingesetzt. Als Referenzgen wurde *NmAct* genutzt. Die behandelten Proben bildeten die mit *D. melanogaster* gefütterten Kannen.



**Abbildung 3.31 Überprüfung der Induzierbarkeit von *NgTLP* und *NrChit1* in *N. mirabilis*-Kannen.**

Die Expression von *NgTLP* und *NrChit1* in offenen *N. mirabilis*-Kannen wurde verglichen. Dabei wurde die nicht gefütterte Kanne als Kontrolle genutzt und die behandelte Probe stellte die mit *D. melanogaster* (*D. m.*) gefütterte Kanne dar. Für den Test wurden ganze Kannen, Drüsen und epidermales Gewebe verwendet. Die experimentelle und statistische Auswertung erfolgte mit REST©. Signifikante Veränderung ( $P(H1) < 0,001$ ) in der Expression sind mit \*\*\* gekennzeichnet.

Die Berechnungen ergaben eine Steigerung der *NgTLP*- und *NrChit1*-Expression in allen Geweben. Beim Betrachten der ganzen Kanne lag eine Verdopplung der Transkriptmengen vor, die allerdings nur bei der Endochitinase signifikant war. Auch bei den Drüsen konnte eine Zunahme der mRNA-Mengen beobachtet werden (*NgTLP*: 1,92; *NrChit1*: 1,76), die aber in beiden Fällen keine

signifikanten Werte ergab. Einen Anstieg der Expressionslevel beider Gene fand im epidermalen Gewebe statt. Die Transkriptmenge beider Gene ist etwa achtmal höher in den Kannen, die mit *D. melanogaster* gefüttert wurden (Abb. 3.31). Damit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *NgTLP* und *NrChit1* durch die Zugabe von Fruchtfliegen induziert werden kann. Alle Ergebnisse der *Real-time* PCR sind im Anhang (Tabelle 6.3) zusammengefasst dargestellt.

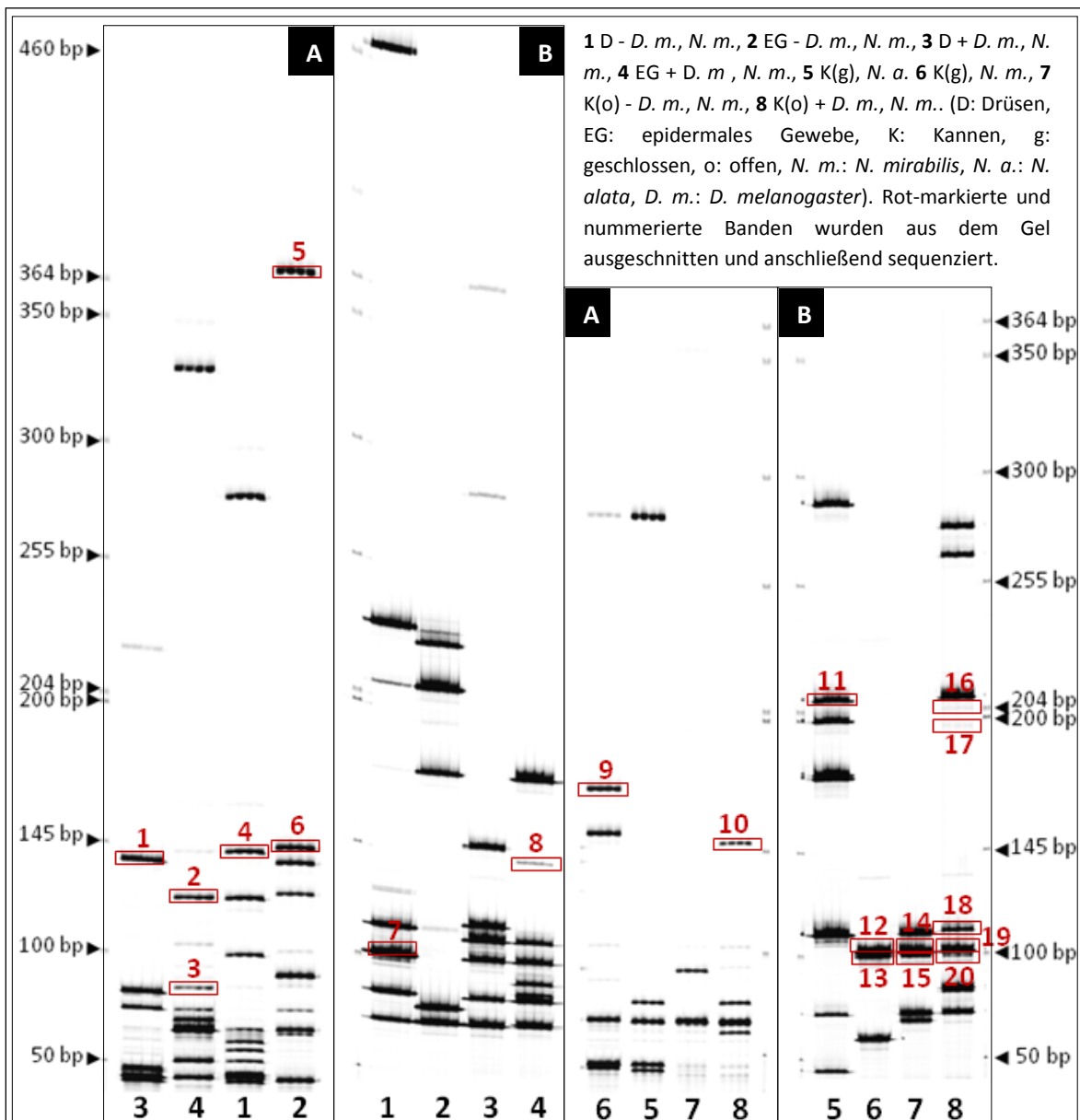
### 3.5.2 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Das AFLP wurde ursprünglich zum gDNA *fingerprinting* genutzt (Vos *et al.*, 1995). In der Abteilung für Entomologie (MPI für Chemische Ökologie, Jena) wurde diese Methode auf cDNA erweitert. Damit ist es möglich Änderungen im Expressionsmuster festzustellen. Das Verfahren sollte an *Nepenthes*-Kannen getestet werden, um Unterschiede in der Expression verschiedener Arten bzw. den Drüsen und dem epidermalen Gewebe derselben Kanne festzustellen. Dabei wurden auch Kannen verwendet, welche mit *D. melanogaster* gefüttert wurden. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass die Expression von *NgTLP* und *NrChit1* durch die Zugabe von Fruchtfliegen induzierbar ist, könnten über diese Methode z.B. neue ebenfalls induzierbare Proteine identifiziert werden. Der Versuch erfolgte zum einen an RNA ganzer Kannen. Dabei wurde das Expressionsmuster von geschlossen *N. alata*- und *N. mirabilis*-Kannen verglichen. Zudem wurden offene *N. mirabilis*-Kannen verwendet, wobei eine der Kannen sieben Tage vor deren Ernte mit 30 Fruchtfliegen gefüttert wurde. Weiterhin erfolgte der Vergleich des Expressionsmusters in Drüsen und epidermalem Gewebe dieser Kannen. Von den Proben wurden 30 bis 800 ng Gesamt-RNA in der reversen Transkription eingesetzt. Die Produkte der Präamplifikation wurden in zwei weiteren PCR-Reaktionen genutzt. Dabei wurde jeweils der *MseI*-Primer (CAT<sub>OL58</sub>) verwendet. Der *EcoRI*-Primer wies die IRDye® 700-Markierung auf und variierte in zwei Nukleotiden am 3'-Ende. In PCR A wurde AAG<sub>700(OL20/OL14)</sub> und in PCR B ACC<sub>700(OL216/OL221)</sub> verwendet. Nach der PCR wurden Ergebnisse in einem Polyacrylamid-Gel separiert und die Fragmente über die Infrarot-Markierung durch einen Laser Scanner dokumentiert. Die Gelbilder sind in Abbildung 3.32 dargestellt. Interessanterweise ergab der Austausch von nur zwei Nukleotiden des *EcoRI*-Primers ein völlig neues Fragmentmuster bei allen Proben (Gel A & B).

Der Vergleich der Expressionsmuster geschlossener Kannen von *N. alata* und *N. mirabilis* zeigte vier übereinstimmende Banden in Gel A (Probe 5 & 6). In Gel B waren alle Fragmente verschieden, wobei sich deutlich mehr Banden bei *N. alata* zeigten. Bei offenen gefütterten *N. mirabilis*-Kannen traten neue Banden in Gel B auf, z.B. die Fragmente 16, 17 und 20, im Vergleich zu geschlossenen bzw. offenen Kannen (Probe 6, 7 & 8), welche keine Fruchtfliegen enthielten.

Ein detaillierteres Bild zeigt sich beim Betrachten der Drüsen und des epidermalen Gewebes offener *N. mirabilis*-Kannen. Interessanterweise waren in diesen Proben mehr Banden zu sehen als bei der Verwendung ganzer Kannen (Proben 1-4). In beiden Geweben zeigt sich ein Rückgang der Expression einzelner Proteine nach der Fütterung mit *D. melanogaster* (Vergleich Probe 1 & 2 mit 3 & 4). Beispielsweise verschwinden die Fragmente 4 und 6 (Gel A) bzw. 7 (Gel B). Dies ist an der Abnahme der Intensität bzw. am Fehlen der Banden zu erkennen. Andere Proteine scheinen stärker oder erst nach Zugabe der Fruchtfliegen exprimiert zu werden, z.B. Fragment 1 und 3 (Gel A) bzw. 8 (Gel B). Weiterhin erscheinen Banden nach der Fütterung in den Proben des umliegenden Gewebes (Probe 4), die zuvor nur in den Proben der Drüsen (Probe 1) zu sehen waren (z.B. Fragment 2, Gel A).





**Abbildung 3.32 Ergebnis zweier AFLP-Amplifikationen nach Auftrennung in Polyacrylamid-Gelen.**

Die Präamplifikation erfolgte mit dem Primerpaar *Mse*-0 und *Eco*RI-0. Davon erfolgten anschließend zwei weitere PCR-Reaktionen, wobei die Primer *Mse*I (*CAT*<sub>OL58</sub>) und dem *Eco*RI verwendet wurden. Der *Eco*RI-Primer war mit IRDye® 700 markiert und unterschied sich in zwei Nukleotiden am 3'-Ende in PCR A (*AAG*<sub>700(OL20/OL14)</sub>) und B (*ACC*<sub>700(OL216/OL221)</sub>). Nach der Amplifizierung wurden die Fragmente in einem 8%-igen Polyacrylamid-Gel im LI-COR Global IR2 4200LI-I Sequencing System separiert, wobei jeweils 0,8 µl jeder Probe viermal nebeneinander aufgetragen wurden. Gel A und B entsprechen hierbei den Produkten von PCR A bzw. B. Die Infrarot-markierten DNA-Fragmente wurden während der Auftrennung über einen Laser Scanner bei 700 nm detektiert. Die Bestimmung der Fragmentgröße erfolgte über einen markierten Standard (LI-COR STR Marker, LI-COR) im Bereich von 50 bis 700 bp.

Eine konkrete Interpretation der Gele ist aber nur möglich, wenn die Identität der Fragmente bekannt ist. Deswegen wurden einzelne Banden aus den Gelen ausgeschnitten und sequenziert. Diese Fragmente sind in Abbildung 3.22 rot gekennzeichnet (Nr. 1-20). Die resultierenden Sequenzen wurden in Datenbanken auf Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen v.a. anderer Pflanzen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 dargestellt. Die meisten Proben zeigten

Ähnlichkeiten zu cDNA-Sequenzen unbekannter Funktion (3, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 18 & 20) oder cDNA-AFLP-Fragmenten (1, 4, 8 & 10). Für Sequenz 19 konnte keine Ähnlichkeit zu bekannten Nukleotidsequenzen gefunden werden. Sequenz 2 aus dem epidermalen Gewebe von gefütterten *N. mirabilis*-Kannen wies Ähnlichkeiten zu einem putativen Polyol-Transporter-Protein aus *Hevea brasiliensis* (AM924133) auf. Die Fragmente 16 und 17 aus ganzen gefütterten *N. mirabilis*-Kannen zeigten eine 100 %-ige Übereinstimmung mit der mRNA-Sequenz einer Acyl-CoA- $\Delta$ 9-Desaturase aus der Hummel (*Bombus terrestris*).

Tabelle 3.5 Ergebnis der NCBI-Datenbank-Analyse der über AFLP ermittelten Sequenzen.

Nr.	Größe	Bezeichnung	Organismus	Akzessions-Nr.	Ähnlichkeiten
1	117 bp	cDNA-AFLP-Fragment 041BT42M21-217.9	<i>Sesbania rostrata</i>	EF416122.1	100%
2	127 bp	mRNA, putative polyol transporter protein	<i>Hevea brasiliensis</i>	AM924133.1	87%
3	136 bp	hypothetical protein, mRNA	<i>Sorghum bicolor</i>	XM_002445720.1	83%
4	123 bp	cDNA-AFLP-Fragment 034BT33M33-308.6	<i>Sesbania rostrata</i>	EF416006.1	100%
5	128 bp	contig VV78X214800.34	<i>Vitis vinifera</i>	AM477065.2	90%
6	210 bp	NF008B07IN1F1058 Insect herbivory cDNA	<i>Medicago truncatula</i>	BE322467.2	89%
7	121 bp	WD40 domain containing protein, mRNA	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_114826.3	100%
8	125 bp	cDNA-AFLP-Fragment	<i>Medicago truncatula</i>	DQ455079.1	100%
9	144 bp	Os02g0741400 mRNA	<i>Oryza sativa</i>	NM_001054616.1	95%
10	134 bp	AFLP molecular marker	<i>Borojoa patinoi</i>	AY721982.1	100%
11	182 bp	clone Pop1-124E10	<i>Populus trichocarpa</i>	AC182658.2	87%
12	133 bp	BNAPO4GH_T3_003_G07, mRNA	<i>Brassica napus</i>	GR458852.1	90%
13	126 bp	cDNA-clone: OSIGCPI006J19	<i>Oryza sativa</i>	CT829444.1	100%
14	128 bp	SRN_T3_162_C03	<i>Solanum tuberosum</i>	JG566146.1	96%
15	131 bp	Contig5017.Bote mRNA	<i>Bombus terrestris</i>	J1030626	94%
16	180 bp	Acyl-CoA- $\Delta$ 9-Desaturase-mRNA	<i>Bombus terrestris</i>	FM955618.1	98%
17	183 bp	Acyl-CoA- $\Delta$ 9-Desaturase-mRNA	<i>Bombus terrestris</i>	FM955618.1	98%
18	131 bp	cDNA-clone OSIGCEA011P11	<i>Oryza sativa</i>	CT860295.1	87%
19	125 bp	/	/	/	/
20	124 bp	cDNA-clone: bphyem204g24	<i>Phyllostachys edulis</i>	FP092261.1	92%

Karnivore Pflanzen der Gattung *Nepenthes* besitzen Gleitfallen, mit denen Beute angelockt, gefangen und verdaut wird (Kato *et al.*, 1993; Adam, 1997). Dabei erfolgt die Zersetzung der Beute über pflanzeigene Enzyme, die im Kannensekret vorliegen (Barthlott *et al.*, 2004; Mithöfer, 2011). Die Identifizierung einiger dieser Proteine erfolgte schon frühzeitig. So wurden v.a. Proteinasen aus der Verdauungsflüssigkeit geschlossener Kannen aufgereinigt (Steckelberg *et al.*, 1967; Amagase *et al.*, 1969 & 1972; Amagase, 1972; Jentsch, 1972; Jentsch *et al.*, 1989). Weiterhin konnten durch simple Aktivitätsbestimmungen auch andere Enzyme, wie Esterasen, Amylasen, Chitinasen, Lipasen, Peroxidasen, Phosphatasen, Ribonukleasen und Transaminasen, im Kannensekret nachgewiesen werden (Amagase *et al.*, 1972; Juniper *et al.*, 1989). In den letzten Jahren erfolgte auch ein Nachweis verschiedener Proteine aus *Nepenthes*-Kannen auf molekularbiologischer Ebene. So konnten u.a. die Sequenzen von Chitinasen (Eilenberg *et al.*, 2006; Hatano & Hamada, 2008; Rottloff *et al.*, 2011), den sauren Proteinasen Nepenthesin I und II (Athauda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2005) und Ribonukleasen (Stephenson & Hogan, 2006) aus dem Kannengewebe isoliert werden. Die Aktivität dieser Enzyme war auch im Verdauungsssekret nachweisbar. Die Identifizierung neuer Kannenproteine erfolgt meist über eine proteomische Analyse des Verdauungsssekrets (Hatano & Hamada, 2008). Ein ähnlicher Ansatz wurde auch in unserer Arbeitsgruppe angewandt. Die Analyse erfolgte am Sekret geschlossener Kannen. Dieses ist steril und sollte nur pflanzeigene Proteine enthalten, womit sich eine Kontamination mit z.B. bakteriellen Proteinen ausschließen lässt (Rott, 2006). Jedoch ist in geschlossenen Kannen nur ein begrenztes Volumen an Sekret (oft unter 1 ml) verfügbar. Außerdem ist die Konzentration der in der Flüssigkeit enthaltenen Proteine sehr gering (1 µg/ml) (Rottloff, 2006). Deshalb mussten die Sekrete verschiedener *Nepenthes*-Arten gesammelt und vereinigt werden, um genügend Material für eine elektrophoretische Auftrennung im 2D-Gel zu erhalten. Die Proteine wurden danach tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide über Massenspektrometrie sequenziert (Rottloff, 2006). Über diesen Ansatz konnten anschließend ausgehend von den Peptidsequenzen die Vollängen-cDNA eines *Thaumatin-like proteins* (Rottloff, 2006), einer Chitinase (Stieber, 2006) und eines PR-1-Proteins (Rott, 2009) über mehrere Amplifikationsverfahren isoliert werden. Da dieses Verfahren der Proteinidentifizierung sehr zeitaufwendig ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit nach einer alternativen Methode gesucht werden.

#### 4.1 Präparation verschiedener Gewebearten aus *Nepenthes*-Kannen

Die *Nepenthes*-Gleitfalle ist in verschiedene Zonen gegliedert, wobei die unteren zwei Drittel der Kanne die Verdauungszone bilden. An der inneren Zellwand dieser Zone befinden sich zahlreiche multizelluläre Drüsen (Adlassnig *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde die Verdauungszone von acht *Nepenthes*-Arten stereomikroskopisch untersucht. Die Drüsen sind in einer Schicht epidermaler Zellen eingebettet, wobei die erste und zweite Schicht der sekretorischen Zellen hervorragen (Owen *et al.*, 1999; Gorb *et al.*, 2004). Diese werden v.a. im oberen Bereich der Verdauungszone teilweise von einer Haube bedeckt, die von epidermalen Zellen gebildet wird (Abb. 3.16). Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung ist eine Autofluoreszenz der Zellwände v.a. in den

epidermalen Zellen auffällig. Diese haben in ihren lateralen und äußeren Zellwänden Cutin eingelagert (Owen *et al.*, 1999; Gorb *et al.*, 2004). Die Autofluoreszenz ergibt sich wahrscheinlich durch phenolische Verbindungen, die in der Cutinmatrix präsent sind (Laguna *et al.*, 1999). In den sekretorischen Zellen von *N. gracilis*, *N. fusca* und *N. ampullaria* war keine Autofluoreszenz zu beobachten (Abb. 3.16b). Owen und Lennon (1999) stellten ebenfalls Autofluoreszenz in den Drüsen älterer *N. alata*-Kannen fest. Somit ist es wahrscheinlich, dass die Einlagerung von Cutin in die äußeren Wände der sekretorischen Zellen vom Alter der Kanne abhängen. Wie auch die Kannen variieren die Drüsen in Form, Größe und Anzahl zwischen den einzelnen *Nepenthes*-Arten (Tabelle 3.3). Die Vermutung, dass sich eine geringere Anzahl an Drüsen über deren Größe ausgleicht, konnte hier nicht bestätigt werden. Allerdings wurden aufgrund der Drüsenform nur Näherungswerte der Fläche berechnet. Weiterhin fiel bei mikroskopischer Betrachtung der Verdauungszonen auf, dass die Größe der Drüsen zum Kannengrund hin zunimmt. Da artenbedingt verschieden große Kannen und z.T. auch unterschiedliche Bereiche dieser verwendet wurden, ist das Ergebnis mit Vorsicht zu betrachten.

Die sekretorischen Zellen der Drüsen sollen u.a. für die Produktion und Sekretion der Kannenproteine verantwortlich sein (Gorb *et al.*, 2004; Plachno *et al.*, 2006; Thronhill *et al.*, 2008). Um neue Proteine zu identifizieren, wurde deswegen nach einer Methode gesucht um diese Zellen zu präparieren. Eine Möglichkeit um Einzelzellen oder Zellpopulationen aus Gewebekomplexen zu isolieren ist *Laser Capture Microdissection* (LCM) (Emmert-Buck *et al.*, 1996). Die Versuche sekretorische Zellen aus frischem Gewebe von *Nepenthes*-Kannen mit LCM zu präparieren, scheiterten jedoch aufgrund des hohen Wassergehalts des Gewebes und der Stärke der Zellwände (Rottloff *et al.*, 2009). Außerdem werden die Drüsen z.T. von einer aus epidermalen Zellen bestehenden Haube bedeckt (Abb. 3.16b) (Owen *et al.*, 1999). Diese wird bei der Drüsenpräparation über LCM gleichzeitig isoliert. Weiterhin stellt die Extraktion von RNA aus LCM-Präparaten ein Problem dar. RNA ist sehr instabil und kann über den Laser zerstört werden. Deswegen wird das Gewebe zuerst in Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet (Lehmann und Kreipe, 2006). Anschließend muss die Probe vom Paraffin befreit und rehydriert werden (Bock *et al.*, 2001). All diese Schritte können zum Verlust der RNA z.B. durch Degradierung führen. In dieser Arbeit konnte ein Mikropräparationsverfahren entwickelt werden, welches die Nachteile der LCM umgeht. Dazu wurde die aureka®-Plattform der Firma aura optik GmbH genutzt (Abb. 3.17). Dieses System konnte in Zusammenarbeit mit der Firma für die Extraktion der Drüsen aus *Nepenthes*-Kannen optimiert werden. Der Erhalt der gDNA konnte über eine PCR-Reaktion gezeigt werden. Dazu wurden die *NgTLP*- und *NrChit1*-Gene aus den sekretorischen Zellen verschiedener *Nepenthes*-Arten amplifiziert, ohne dass das Gewebe zuvor aufgeschlossen werden musste (Abb. 3.19). Auch die Isolierung von RNA aus den Drüsen ist mit der Mikropräparationsmethode möglich. Unter der Verwendung des Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kits konnte erfolgreich mRNA extrahiert werden. Allerdings musste die gDNA durch mehrmaligen Verdau mit *DNase* entfernt werden. Diese Prozedur bedarf zahlreicher Waschschrte, wodurch wiederum mRNA verloren gehen kann. Besser geeignet war der RNAqueous®-Micro Kit. Hier findet die *DNase*-Behandlung in Lösung statt und das Enzym kann anschließend durch das *DNase Inactivation Reagent* aus der Probe über Zentrifugation entfernt werden. Über diesen Ansatz wurde neben den sekretorischen Zellen auch RNA aus dem epidermalen Gewebe untersucht, welches die Drüsen umgibt. Erstaunlicherweise konnte auch in diesen Zellen das *NgTLP*- sowie das *NrChit1*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Damit stellt sich die Frage, ob neben den Drüsen auch das epidermale Gewebe für die Expression der

Kannenproteine verantwortlich ist. Dazu sollte über *Real-time* PCR geprüft werden, ob die Expression von NgTLP und NrChit1 im Kannengewebe induzierbar ist. Da die Methode bisher nicht bei Nepenthaceae angewandt wurde, musste diese zuvor etabliert werden. Als erstes wurde nach Referenzgenen gesucht. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Transkriptanalysen an verschiedenen Pflanzenarten durchgeführt, die Referenzgene benötigen. Diese wurden herangezogen um über Datenbank-Analysen konservierte Bereiche solcher Gene zu identifizieren, die eventuell auch in *Nepenthes*-Pflanzen auftreten. So konnte ein Actin-Fragment mit den gleichen Primerpaar aus *N. mirabilis*-Kannen identifiziert werden, welches auch in Perlhirse und Banane verwendet wurde (Abb. 3.26) (Van den Berg *et al.*, 2004). In Reis wurden verschiedene Referenzgene getestet, die für Transkriptanalysen in anderen Pflanzen verwendet wurden (Jain *et al.*, 2006). Über Datenbank-Analysen konnten ausgehend von diesen Sequenzen konservierte Bereiche in Genen weiterer Pflanzenarten gefunden werden. Anhand dieser wurden Primerpaare hergestellt, mit denen erfolgreich jeweils eine Teilsequenz der 18S und 26S rRNA-Gene wiederum aus *N. mirabilis*-Kannen identifiziert werden konnte (Abb. 3.27). Nach Überprüfung der jeweiligen Primerpaare in der *Real-time* PCR wurden *NmAct* und *Nm18SrRNA* als Referenzgene verwendet. Mit dieser Methode lassen sich nun mögliche Unterschiede in der Expression von NgTLP und NrChit1 in verschiedenen Geweben von *Nepenthes*-Kannen untersuchen.

#### 4.2 Die Expression von NgTLP und NrChit1 im Kannengewebe

Wie zuvor beschrieben, werden NgTLP und NrChit1 sowohl in den sekretorischen Zellen der Drüsen als auch im umliegenden epidermalen Gewebe exprimiert. Über *Real-time* PCR wurde nun untersucht, ob es Unterschiede in den jeweiligen Transkriptmengen zwischen den Gewebearten in geschlossenen *N. alata*- und *N. mirabilis*-Kannen gibt. Erstaunlicherweise war das Expressionslevel der Endochitinase im epidermalen Gewebe beider Arten signifikant höher. Im Gegensatz dazu wird das *Thaumatin-like protein* in den Drüsen höher exprimiert. Dieser Zustand ändert sich aber nach Beutefang. Dann findet die TLP-Produktion hauptsächlich im epidermalen Gewebe statt (Abb. 3.29). Owen *et al.* (1999) konnten über eine elektronenmikroskopische Analyse der Drüsen zeigen, dass ER und Golgi-Apparat zwar in den sekretorischen Zellen vorhanden sind, allerdings nicht in so hohem Maße, wie man es von Zellen annehmen würde, die für die Synthese und Sekretion von Proteinen verantwortlich sind. Allerdings schlossen sie nicht aus, dass mögliche Stimuli zu einer Vermehrung von ER und Golgi führen könnten und damit zu einer erhöhten Proteinsekretion. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen weisen aber auf eine höhere Produktion von NgTLP und NrChit1 im epidermalen Gewebe hin. Um Einblicke in die molekulare Regulierung zu erhalten, wurde die Expression beider Proteine in offenen Kannen von *N. mirabilis* unter An- bzw. Abwesenheit von Beute (*D. melanogaster*) überprüft. Bei Betrachtung ganzer Kannen und der Drüsen kam es nur zu einem sehr schwachen Anstieg der Transkriptmenge beider Proteine nach der Fütterung. Dieser war auch nur für die Endochitinase in ganzen Kannen signifikant. Im epidermalen Gewebe trat ein drastischer und signifikanter Anstieg in der Transkriptmenge von NgTLP und NrChit1 ein. Damit ist wahrscheinlich das epidermale Gewebe für die Produktion der Kannenproteine zumindest mitverantwortlich. Allerdings wurde gezeigt, dass der Austausch zwischen Sekret und Gewebe der Verdauungszone ausschließlich über die sekretorischen Zellen stattfindet (Owen *et al.*, 1999). NgTLP und NrChit1 weisen aber beide ein

putatives N-terminales Signalpeptid auf, welches auf einen Transport in den Apoplasten hinweist. Die Proteine könnten eventuell über den apoplastischen Transportweg zu den sekretorischen Zellen gelangen. Jedoch zeigten Untersuchungen an Drüsen geschlossener *N. alata*-Kannen, dass die Übergänge von epidermalen zu sekretorischen Zellen durch Cutineinlagerungen blockiert sind. Dies wurde über den Elektronendichte-Tracer Lanthanum ermittelt. Die Substanz weist auf offene apoplastische Räume hin, da diese weder Membranen noch durch Cutineinlagerungen verstärkte Zellwände passieren kann. Wird Lanthanum in die Kannenflüssigkeit gegeben, lagert sich die Substanz in die erste Zellschicht der Drüsen ab. Lanthanum gelangt nur in die Zellwandräume der umliegenden epidermalen Zellen, wenn es über den Kannenstiel injiziert wird. Dies zeigt, dass die Drüsen geschlossener *N. alata*-Kannen über Cutineinlagerungen apoplastisch abgegrenzt sind (Owen *et al.*, 1999). Dies könnte einerseits bedeuten, dass die Proteine nach der Sekretion durch die epidermalen Zellen direkt in die Kannenflüssigkeit gelangen. Da diese Zellen in zahlreichen *Nepenthes*-Arten von einer Wachsschicht bedeckt sind, ist dies aber unwahrscheinlich. Andererseits wurden die Aktivitäten verschiedener hydrolytischer Enzyme u.a. auch von Esterasen im Verdauungssekret gemessen (Juniper *et al.*, 1989). Da Cutin ein Polyester ist, könnte das Polymer z.B. über Esterasen gespalten werden (Kolattukudy, 2005). Weiterhin kann auch ein symplastischer Transport der Proteine bzw. der diese enthaltenen Vesikel in die sekretorischen Zellen nicht ausgeschlossen werden. Diese Theorien müssten jedoch experimentell überprüft werden.

In den *Real-time* PCR-Experimenten wurden außerdem eventuelle Unterschiede in den *NgTLP*- und *NrChit1*-Transkripten verschiedener Arten ermittelt. Dazu wurden geschlossene Kannen von *N. alata* und *N. mirabilis* genutzt. In allen durchgeführten Experimenten war immer eine höhere Transkriptmenge beider Proteine in *N. alata* zu beobachten (3.30), die wiederum im epidermalen Gewebe sehr deutlich und signifikant auftrat. Das Experiment zeigt, dass es sehr wohl Unterschiede in der Proteinexpression des Kannengewebes verschiedener Arten gibt. Dies macht Sinn, da die Kannen verschiedener *Nepenthes*-Arten in Größe und Form sowie der Sekretmenge variieren (Barthlott, *et al.*, 2004) und somit auch der Proteingehalt des Verdauungssekrets unterschiedlich sein kann.

#### 4.3 Weitere Transkriptanalysen in *Nepenthes*-Kannen

Die in dieser Arbeit vorgestellte Präparationsmethode kann neben der Expressionsanalyse bestimmter Gene, auch für Transkriptstudien und dabei zur Identifizierung neuer mRNA-Sequenzen verwendet werden. Neben der Anfertigung von cDNA-Bibliotheken ist auch das AFLP-Methode möglich. Dieses Verfahren wurde ursprünglich zum gDNA *fingerprinting* genutzt (Vos *et al.*, 1995), kann aber auch auf mRNA- bzw. cDNA-Ebene durchgeführt werden. Mit AFLP können Unterschiede im Expressionsmuster, ausgelöst durch verschiedene Stimuli, über den Verdau mit Restriktionsenzymen und anschließender Fragment-Amplifikation nachgewiesen werden. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente können diese sequenziert und über Datenbank-Analyse identifiziert werden. In Abschnitt 3.5.2 sind die Ergebnisse des Vorversuchs dargestellt. Für das Experiment wurden geschlossene Kannen von *N. alata* und *N. mirabilis* miteinander verglichen. Weiterhin erfolgte die Analyse von *N. mirabilis*-Kannen verschiedener Stadien (geschlossen, offen, offen & gefüttert). Der Vergleich der Transkriptionsmuster

verschiedener Gewebe erfolgte nur bei offenen Kannen von *N. mirabilis* in An- bzw. Abwesenheit von Beute. Die aus den Experimenten resultierenden Gele zeigten gut separierte Banden. Vor allem in den Proben der sekretorischen und epidermalen Zellen waren zahlreiche Fragmente zu sehen, die erst nach Fütterung mit *D. melanogaster* auftraten (Abb. 3.32). Hier war die Anzahl neuer Fragmente im epidermalen Gewebe größer als in den Drüsen. Um Informationen über die Transkripte zu erhalten, mussten diese sequenziert werden. Allerdings zeigte der Großteil der Sequenzen nur Ähnlichkeiten zu AFLP-Fragmenten und hypothetischen mRNA-Sequenzen anderer Pflanzen. Nur ein putatives Polyol-Transporter-Protein konnte aus epidermalen Zellen gefütterter *N. mirabilis*-Kannen isoliert werden. Diese Proteine sind in der Plasmamembran lokalisierte Energie-abhängige  $H^+$  / Polyol-Co-Transporter. Neben azyklischen Polyolen (z.B. Mannitol und Sorbitol) kann der *A. thaliana* Polyol-Transporter 5 (AtPLT5) verschiedene andere Kohlenhydrate, z.B. Triosen (Glycerol), Pentosen (Ribose) und Hexosen (Glucose) in die Zelle transportieren (Klepek *et al.*, 2005; Dusotoit-Coucaud *et al.*, 2010). Zwei Fragmente zeigten eine 100%-ige Übereinstimmungen mit der Sequenz einer Acyl-CoA- $\Delta^9$ -Desaturase aus der Hummel (*Bombus terrestris*). Diese Banden traten ebenfalls erst nach Fütterung der *N. mirabilis*-Kanne auf und wurden von mRNA ganzer Kannen amplifiziert. Da beide Sequenzen hohe Ähnlichkeiten zu Insekten-Desaturasen zeigen, könnte eine Verunreinigung vorliegen. Allerdings wurde die Kanne vor der RNA-Extraktion gründlich gereinigt. Damit ist es sehr unwahrscheinlich das mRNA von *D. melanogaster* co-isoliert wurde. Außerdem kommen Desaturasen auch in höheren Pflanzen vor (Fukuchi-Mizutani *et al.*, 1998). Diese Enzyme führen Doppelbindungen in Fettsäuren ein (Cahoon *et al.*, 1997).

Um über das AFLP weitere Sequenzinformationen v.a. von Proteinen zu erhalten, die am Verdauungsprozess bzw. der Nährstoffaufnahme beteiligt sind, sollte man die Auswahl des Primerpaares in der Präamplifikation überdenken. In dem hier durchgeführten Experiment wurde der *Mse*-0- und *Eco*-0-Primer verwendet. Vor der PCR erfolgte ein Verdau der Probe mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI (*rarely cutter*) und *Mse*I (*frequent cutter*). Somit entstehen drei Fragmente verschiedener Länge: *Mse*I / *Mse*I; *Mse*I / *Eco*RI; *Eco*RI / *Eco*RI. Über die hier verwendeten Primer werden Fragmente mittlerer Länge amplifiziert (*Mse*I / *Eco*RI).

**Tabelle 4.1 Anzahl der *Eco*RI- und *Mse*I-Schnittstellen (Schnittst.) in mRNA-Sequenzen bekannter Proteine aus dem *Nepenthes*-Verdauungssekret**

Protein	Nepenthes-Art	Akzessions-Nr.	Anzahl d. <i>Mse</i> I-Schnittst.	Anzahl d. <i>Eco</i> RI-Schnittst.
PR-1	<i>N. mirabilis</i>	GQ337079	0	0
NgTLP	<i>N. gracilis</i>	DQ352144	5	0
Glucanase	<i>N. khasiana</i>	DQ286866	1	0
Nepenthesin I	<i>N. gracilis</i>	AB114914	7	0
Nepenthesin II	<i>N. gracilis</i>	AB114915	1	0
Chitinase 1-1	<i>N. khasiana</i>	AY618882	0	0
Chitinase 1-2	<i>N. khasiana</i>	AY618884	0	0
Chitinase 2-1	<i>N. khasiana</i>	AY618886	0	0
Chitinase 2-2	<i>N. khasiana</i>	AY618888	0	0
Chitinase Kl. IV	<i>N. alata</i>	AB289807	4	0
NrChit1	<i>N. rafflesiana</i>	DQ530442	2	0



Die bisher aus dem Verdauungssekret identifizierten Proteine bestehen aus 160 (PR-1-Protein) bis 440 AS (Nepenthesin I & II) und enthalten in den kodierenden mRNA-Sequenzen keine *EcoRI*-, jedoch oftmals mehrere *MseI*-Schnittstellen (Tabelle 4.1). Demzufolge würden wahrscheinlich unter Verwendung von *MseI*-Adapter-spezifischen Primern mehr mRNA-Fragmente von Proteinen amplifiziert, welche für den Verdauungsprozess relevant sind. Dies sollte unbedingt experimentell überprüft werden.

#### 4.4 Expression des *Thaumatococcus*-like proteins und der Chitinase

Wie oben erwähnt, konnten in unserer Arbeitsgruppe die cDNA-Sequenzen eines *Thaumatococcus*-like proteins aus *N. gracilis* (NgTLP) und einer Chitinase aus *N. rafflesiana* (NrChit1), über einen proteomischen Ansatz kombiniert mit molekularbiologischen Methoden, isoliert werden. Um die Proteine funktionell charakterisieren zu können, wurden diese in *E. coli* heterolog exprimiert.

Für die Expression von NgTLP kamen verschiedene Systeme zur Anwendung. Zuerst wurde die NgTLP-Sequenz in den pQE-30-Vektor kloniert und das Protein konnte sowohl in *E. coli* M15[pREP4] als auch SG13009[pREP4] löslich exprimiert werden. Allerdings war es nicht möglich NgTLP über Ni-NTA-Agarose aufzureinigen. Eine Erklärung könnte in der Tertiärstruktur des Proteins liegen, wodurch die sechs N-terminal eingeführten Histidin-Reste eventuell unzugänglich sind. Da aber auch die Aufreinigung unter denaturierten Bedingungen erfolglos blieb, ist es wahrscheinlicher, dass der His-Tag z.B. über bakterielle Proteasen entfernt wurde. Als nächstes wurde mit dem pHIS-8-3-Vektor ein T7-Expressionssystem gewählt. Dieser ist eine Modifikation des Plasmids pET-28a und weist neben der T7-Promotor-Sequenz einen N-terminalen 8xHis-Tag auf (Jez *et al.*, 2000). Die Expression fand in *E. coli* BL21(DE3) statt und ergab nur unlösliches NgTLP, welches in sogenannten *inclusion bodies* vorlag (Van den Berg *et al.*, 1999; Sørensen & Mortensen, 2005). Erst über die Kombination des T5- und T7-Systems konnte NgTLP exprimiert und anschließend aufgereinigt werden (Abb. 3.1). Dabei wurde NgTLP in die Vektoren pQE-16 und -70 kloniert und konnte in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden. Dies ist interessant, da pQE-Vektoren über einen T5-Promotor exprimiert werden und der BL21(DE3)-Stamm das T7-RNA-Polymerasegen besitzt. Allerdings sind aus der Literatur Beispiele bekannt, in denen Proteine über pQE-Vektoren in *E. coli* BL21(DE3) heterolog exprimiert wurden (Lan *et al.*, 2000; Schlicke & Brakmann, 2005; Lan *et al.*, 2008). Der T5-Promotor muss hier von einer anderen *E. coli*-RNA-Polymerase erkannt werden. Da dieser über zwei *lac*-Operator-Sequenzen reguliert wird, stellt sich die Frage, wie der LacI-Repressor gebildet wird. Dies kann über zwei Wege erfolgen. Bei der Verwendung von T5-Expressionsstämmen wird dem System das den Repressor kodierende Plasmid pREP4 zugesetzt (Samuelson, 2011). Da die pQE-Vektoren, welche das NgTLP-Insert enthalten (pSR-28 & -30), aus *E. coli* M15[pREP4]-Zellen präpariert wurden, könnte eine Co-Transformation von pREP4 und dem Expressionsplasmid stattgefunden haben. Wahrscheinlicher ist aber die Bildung des LacI-Repressors über ein bakterielles *lacI<sup>q</sup>*-Gen, welches in *E. coli* BL21(DE3) enthalten ist ([http://openwetware.org/wiki/E.\\_coli\\_genotypes](http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes)).

Wie NgTLP konnte auch die Chitinase nicht über das pQE-System exprimiert werden. Deswegen wurde die NrChit1-Sequenz in den pHIS-8-3-Vektor (pRS-6) kloniert. Die Expression in *E. coli* BL21(DE3) ergab nur geringe Mengen an löslicher Chitinase. Der Großteil des exprimierten Proteins lag in *inclusion bodies* vor. Aggregationen oder ein vorzeitiger Abbau der rekombinant in

*E. coli* produzierten Proteine kommen häufig vor und treten aufgrund einer inkorrekten Faltung bei der Bildung der Tertiärstruktur auf. Die Co-Expression molekularer Chaperone kann sich positiv auf die Proteinfaltung auswirken und führte in einigen Fällen zu einer erhöhten Produktion des aktiven Proteins (Nishihara *et al.* 1998 & 2000; Ito & Wagner, 2004). Die wichtigsten Chaperone in *E. coli* sind u.a. DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL und GroES (Mogk *et al.*, 2002). Plasmide, welche diese Chaperone kodieren, sind kommerziell bei der Firma Takara Bio Europe (Saint Germain-en-Laye, Frankreich) erhältlich und wurden jeweils zusammen mit pRS-6 in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Plasmide pKJE7 (Dank-DnaJ-GrpE), pGro7 (GroES-GroEL) und pG-KJE8 (Dank-DnaJ-GrpE, GroES-GroEL) kodieren ausschließlich für Chaperone (Nishihara *et al.*, 1998). Bei der Co-Expression dieser Plasmide konnte allerdings keine Steigerung der NrChit1-Löslichkeit verzeichnet werden. Aber durch die Verwendung von pG-Tf2 und pTf16 stieg die Menge an löslichem Protein deutlich an. Der Effekt war größer, wenn pG-Tf2 co-exprimiert wurde. Beide Plasmide kodieren für den sogenannten Trigger-Faktor (TF), wobei jedoch über pG-Tf2 zusätzlich die Chaperone GroEL und GroES exprimiert werden. Der *E. coli*-TF gehört zu den Chaperone-ähnlichen Faktoren, die eine Rolle in der Proteinfaltung einnehmen. Das Enzym besitzt Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität (PPIase), welche die Bindungsrotation von Amid-Bindungen katalysiert, an denen Prolin beteiligt ist. Außerdem wurde TF in Assoziation mit GroEL gefunden. Dabei verstärkt TF die GroEL-Substrat-Bindung und fördert so die Proteinfaltung oder Degradation bei inkorrektter Faltung (Kandror *et al.*, 1995 & 1997; Nishihara *et al.*, 2000).

NgTLP und NrChit1 wurden anhand der Sequenzinformation bioinformatisch analysiert. Da beide Proteine erfolgreich heterolog exprimiert wurden, konnte eine funktionelle Untersuchung folgen.

#### 4.5 Charakterisierung zweier PR-Proteine aus dem *Nepenthes*-Verdauungssekret

Pathogeninfektionen lösen in Pflanzen eine Reihe von Abwehrreaktionen aus (siehe Abschnitt 1.1). Dazu gehört auch ein induzierbares auf Proteinen basierendes Abwehrsystem, welches durch die 17 Familien der PR-Proteine vertreten wird (Van Loon *et al.*, 2006). In den letzten Jahren wurden diese Proteine auch im Verdauungssekret von *Nepenthes*-Kannen identifiziert (Athauda *et al.*, 2004; Eilenberg *et al.*, 2006; Stephenson & Hogan, 2006; Hatano & Hamada, 2008; Rottloff *et al.*, 2009; Mithöfer, 2011), darunter das *Thaumatin-like protein* isoliert aus *N. gracilis* (Rottloff *et al.*, 2009) und die Chitinase der Klasse III aus *N. rafflesiana* (Stieber, 2006; Rottloff *et al.*, 2009 & 2011).

##### 4.5.1 Das *Thaumatin-like protein* aus *N. gracilis* (NgTLP)

Proteine der PR-5-Familie haben eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Thaumatin, einem süß schmeckenden Protein aus *Thaumatococcus daniellii* und werden deshalb als *Thaumatin-like proteins* bezeichnet. Die TLPs sind in der Natur weit verbreitet und kommen in vielen eukaryotischen Organismen vor (Petre *et al.*, 2011).

Das aus *N. gracilis* isolierte TLP (NgTLP) wird von einer mRNA bestehend aus 678 bp kodiert. Die NgTLP-Gene konnten aus acht verschiedenen *Nepenthes*-Arten isoliert werden (*N. singalana* (GQ338252), *N. ventricosa* (GQ338253), *N. mirabilis* (GQ338250), *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“

(GQ338249), *N. rafflesiana* (GQ338251), *N. henryana* (GQ338248), *N. gracilis* (GQ338247) & *N. ampullaria* (GQ338246)). Diese sind hochkonserviert mit Übereinstimmungen bis zu 100 % und weisen interessanterweise keine Introns in den kodierenden Bereichen auf. Gene, die keine Introns besitzen, werden als Retrogene bezeichnet und entstehen durch Retrotransposition. Dies ist ein zellulärer Prozess, in dem transkribierte und gespleißte mRNA revers transkribiert und in neue Positionen im Genom in Form eines Retrogens wieder eingefügt wird. Diese werden meist zu nicht exprimierten Pseudogenen, da ihnen regulatorische Elemente (z.B. Promotor, Enhancer & Silencer) fehlen (Wang *et al.*, 2006). In den letzten Jahren gab es mehrere Berichte über den Verlust von Introns in Pflanzen. Studien an *A. thaliana* und *O. sativa* zeigten, dass 12,6- bzw. 9,8-mal mehr Introns verloren wurden als hinzukamen (Roy & Penny, 2007). In *Populus* wurden 106 Retrogene identifiziert, wobei diese meist funktionell waren (Zuh *et al.*, 2009). *NgTLP* ist ebenfalls kein Retrogen, da dessen Expression über *Real-time* PCR nachweisbar war. Das *tlxi*-Gen aus Weizen besitzt ebenfalls keine Introns und kodiert für ein TLP des S-Typs (Fierens *et al.*, 2007). Auch das *SniOLP*-Gen eines *Osmotin-like proteins* aus *Solanum nigrum* zeigt keine Introns in der kodierenden Region (Jami *et al.*, 2007). In Abbildung 6.4 ist das Alignment von *NgTLP* mit sechs weiteren TLPs anderer Pflanzenarten dargestellt. Dabei wurden neben mRNA- auch drei Gensequenzen (*F. ananassa* (AF199508), *T. cacao* (AY766059) & *P. trichocarpa* (XM\_002325041)) verwendet, wobei auch diese keine Introns aufwiesen. Möglicherweise bestehen die kodierenden Regionen von Genen der PR-5-Familie generell nur aus einem Exon. Auch die *PR-1*-Gene aus *Oryza sativa* (Liu & Xue, 2006) und *N. mirabilis* (Rott, 2009) weisen nur ein Exon auf.

*NgTLP* besitzt ein Molekulargewicht von 21 kDa und gehört damit zu den L-Typ TLPs (Liu *et al.*, 2010). Das Protein besteht aus 225 AS, wobei die ersten 24 AS ein putatives N-terminales Signalpeptid bilden (Abb. 3.3). Dieses weist auf einen sekretorischen Transport des Proteins in die Kannenflüssigkeit hin. Dieser Weg ist sehr wahrscheinlich, da *NgTLP* über einen proteomischen Ansatz aus dem Verdauungsekret isoliert wurde. Die darüber identifizierten Peptidsequenzen APGGCNPCTVFK, NLCP und DDATSTYTCPPG finden sich in der Primärstruktur von *NgTLP* (<sup>160</sup>A-<sup>172</sup>F, <sup>194</sup>N-<sup>197</sup>P & <sup>205</sup>D-<sup>216</sup>G) wieder (Rottloff, 2006). Wie auch andere TLPs des L-Typs weist das Protein die 16 konservierten Cystein-Reste auf, welche acht potentielle Disulfidbrücken bilden (Abb. 3.22). Diese erhöhen die Stabilität des Moleküls und verhindern somit z.B. eine proteolytische Spaltung (Smole *et al.*, 2008). *NgTLP* scheint ebenfalls eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen zu besitzen, denn auch nach langer Lagerung bei 4 °C war das Protein noch in einem SDS-Gel nachweisbar. Im Gegensatz zu den Proteinen anderer Pflanzenarten ist das Thaumatin\_1-Motiv (Jami *et al.*, 2007; Tachi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011) nicht in TLPs von *Nepenthes*-Kannen zu finden (Abb. 3.21 & 22). Die Funktion dieses Motivs ist allerdings noch unbekannt.

Die *NgTLP*-3D-Struktur konnte anhand der Kristallstruktur von Ban-TLP aus *Musa acuminata* (Leone *et al.*, 2006) modelliert werden und zeigt die generelle Tertiärstruktur der PR-5-Proteine, welche von drei Domänen gebildet wird (Liu *et al.*, 2010). Größtenteils variiert *NgTLP* in Domäne II und III von Ban-TLP und anderen PR-5-Proteinen. Domäne II besitzt nur eine  $\alpha$ -Helix, zwei Schleifen und ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt. Domäne III besteht neben der kurzen Schleife, aus einem kurzen und einem langen  $\beta$ -Faltblatt. Letzteres ist eine Verlängerung von Domäne I, ähnlich der Struktur des Osmotins aus *Nicotiana tabacum* (Min *et al.*, 2004) sowie von Thaumatin I und II aus *T. daniellii* (Masuda *et al.*, 2011) (Abb. 3.5). Im Gegensatz zum Thaumatin I fehlt *NgTLP* die sogenannte Thaumatin-Schleife (KGDAALDAGGR), welche aufgrund der Ähnlichkeit zu den Peptid-Süßstoffen DAA- und DAG-Methyl-Ester für den süßen Geschmack des Proteins verantwortlich

sein soll (Slootstra *et al.*, 1995). Jedoch besitzt das Protein die zentrale Spalte und die vier hochkonservierten sauren AS-Reste. Diese kommen neben einem Arginin in vielen PR-5-Proteinen mit antimykotischer Wirkung vor (Tachi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Beispielsweise inhibieren Zeamatin aus Mais sowie Osmotin und PR-5 aus Tabak das Wachstum von *Candida albicans*, *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa* und *Cercospora beticola* (Vigers *et al.*, 1992). Auch PR-5d aus Tabak inhibiert das Wachstum von *N. crassa*, *T. reesei*, *F. oxysporum* und *Alternaria solani* (Koiwa *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde die Wirkung von NgTLP auf *C. herbarum*, *M. anisopliae*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. decemcellulare* und *F. proliferatum* im Agardiffusionstest überprüft. Trotz langer Inkubationszeiten war allerdings keine wachstumsinhibierende Wirkung des Proteins auf die Pilze zu beobachten. Bei *F. decemcellulare*, *F. proliferatum*, *C. herbarum* und *M. anisopliae* konnte zwar eine Änderung der Luftmyzelbildung verzeichnet werden, welche aber nicht reproduzierbar war (Abb. 3.7 & 3.8). Hohe Konzentrationen an PR-5d vermindert z.B. die Sporenbildung von *T. reesei* (Koiwa *et al.*, 1997). Ein Aufbruch der Hyphen von *N. crassa* sowie *C. albicans*-Zellen wurde z.B. für das Tabak-Osmotin und Zeamatin beschrieben (Roberts & Selitrennikoff, 1990; Vigers *et al.*, 1992). Deshalb wurde der Einfluss von NgTLP auf das Wachstum des Bakteriums *P. syringae* pv. *syringae* sowie der Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* in Flüssigmedium überprüft (Abb. 3.9). Das Protein hatte keinen Einfluss auf *P. syringae*. Bei der Hefe *S. cerevisiae* konnte oftmals ein Rückgang der Zellzahl nach etwa 10 h beobachtet werden. Ein PR-5-Protein aus Tabak löst in *S. cerevisiae* den programmierten Zelltod aus, dem allerdings eine Akkumulation von ROS vorausgeht (Narasimhan *et al.*, 2001). Da eine Inhibierung der Sporenbildung bzw. ein Zellaufbruch von Hefen durch TLPs bereits beschrieben wurde, könnte dies durchaus auf eine antimykotische Wirkung von NgTLP hinweisen. Allerdings können über das hier durchgeführte Experiment nur Hypothesen aufgestellt werden, die über sensitivere Methoden überprüft werden müssen. De Freitas *et al.* (2011) stellte kürzlich eine Methode vor, mit welcher die Permeabilisierung der Membranen von Sporen und Hyphen über die Aufnahme von Propidiumiodid beobachtet werden kann. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nur beschädigte Plasmamembranen passieren kann. Über diesen Test konnte gezeigt werden, das Osmotin (CpOsm) aus *Calotropis procera* in einer Konzentration von 10 µM die Sporen und Hyphen von *Fusarium solani* permeabilisiert.

Die potentielle antimykotische Wirkung von NgTLP sollte weiter verfolgt und z.B. an anderen Pilzarten getestet werden. Es ist jedoch fraglich, wie groß die physiologische Relevanz dieser Organismen in der Kannenflüssigkeit ist, die über einen sauren pH-Wert sowie den hydrolytischen Enzymen einen recht unfreundlichen Lebensraum bietet. PR-Proteine, die auch im Kannensekret vorkommen, werden aufgrund von Infektionen exprimiert (Van Loon *et al.*, 2006). Deswegen wurden in dieser Arbeit v.a. phytopathologische Pilze getestet. Allerdings ist wenig darüber bekannt, ob diese oder andere Mikroorganismen im Verdauungssekret enthalten sind. Schon Juniper *et al.* (1989) postulierte das Vorkommen von Bakterien und Pilzen im Kannensekret. Bei *Nepenthes*-Kannen befinden sich Pilze und Bakterien z.B. an Deckel und Peristom und gelangen über Niederschlag in das Verdauungssekret (Shivas & Brown, 1989). Auch über die Beute können Mikroorganismen eingeschleppt werden, welche in Assoziation mit z.B. Ameisen vorkommen (Schoenian *et al.*, 2011). Shivas und Brown (1989) fanden Hefen in der Flüssigkeit von *Nepenthes*-Kannen. Dabei wurden v.a. Pflanzen in ihrem natürlichen Lebensraum auf Malaysia untersucht. *Cryptococcus albidus* trat als dominante Art im Sekret von *N. gracilis*, *N. mirabilis*, *N. macfarlanei* und *N. sanguinea* auf. Weiterhin konnten *Aureobasidium pullulans*, *Bullera alba*, *Candida diffluens* (Synonym: *Rhodotorula diffluens*), *Rhodotorula rubra*, *Sporobolomyces roseus*, *Tilletiopsis* sp. und

*Trichosporon pullulans* (heute: *Guehomyces pullulans*; Fell & Scorzetti, 2004) isoliert werden. Über die Amplifizierung bakterieller 16S rRNA-Gene erfolgte der Nachweis von *Burkholderia* sp. (39 %), *Variovorax* sp. (27 %) und acidophiler Bakterien im Sekret von *N. hybrida*-Kannen (Morohoshi *et al.*, 2011). Allerdings ist bis heute nichts über das Vorkommen filamentöser Pilze in den Kannen bekannt.

Die Wirkungsweise der antimykotischen Aktivität wird ebenfalls diskutiert. Einige TLPs können Glucan, einen Bestandteil der Pilzzellwand, binden (Trudel *et al.*, 1998). Andere wiederum besitzen  $\beta$ -1,3-Glucanase-Aktivität (Grenier *et al.*, 1999 & 2000). Letzteres wäre eine nützliche Funktion im Verdauungsprozess und wurde über einen photometrischen sowie über den Substratplattentest überprüft, allerdings mit negativem Ergebnis (Abb. 6.2). Glucanase-Aktivität wird recht häufig als Funktion der TLPs diskutiert, da diese das katalytische Glu-Asp-Paar besitzen, welches für die hydrolytische Spaltung von  $\beta$ -1,3-Glucan essentiell ist. Ghosh und Chakrabarti (2008) postulierten anhand von NP24-I, einer Isoform des TLPs NP-24 aus Tomate, die zentrale Spalte als Bindestelle für  $\beta$ -1,3-Glucan. Weiterhin begründeten sie die Unterschiede der Aktivitäten mit der Entfernung der Glutaminsäure- und Asparaginsäure-Reste. In NP24-I sind die beiden AS-Reste über 5 Å voneinander entfernt, weshalb das Protein nur geringe  $\beta$ -1,3-Glucanase-Aktivität aufweist. Möglicherweise verhält es sich beim NgTLP ähnlich und die hydrolytische Aktivität sollte mit anderen Methoden nochmals überprüft werden. Solch ein Nachweisverfahren wäre z.B. die sogenannte PACE (*polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis*; Goubet *et al.*, 2002). Neben der Glucanase-Aktivität kann über diese Methode auch teilweise die Länge der Spaltprodukte bestimmt werden (Fliegmann *et al.*, 2004 & 2005).

Eine seltener auftretende Funktion der TLPs ist die Hemmung hydrolytischer Enzyme wie Xylanasen,  $\alpha$ -Amylasen und Trypsin. Letzteres wurde für Zeamatin beschrieben, einem 22 kDa-Protein, welches neben der antimykotischen Aktivität auch Trypsin sowie  $\alpha$ -Amylasen von Insekten und Bakterien inhibieren soll (Schimoler-O'Rourke *et al.*, 2001). Eine genauere Untersuchung des Samenextrakts aus Mais ergab allerdings geringe Konzentrationen eines 14 kDa-Proteins, welches als Trypsin/ $\alpha$ -Amylase-Inhibitor identifiziert wurde (Gómez-Leyva & Blanco-Labra, 2001). Auch über NgTLP konnte Trypsin nicht gehemmt werden (Abb. 3.10).

Eine Xylanase-Inhibitor-Aktivität wurde bisher nur für TLXI aus Weizen, einem S-Typ TLP, beschrieben (Fierens *et al.*, 2007; Gusakov, 2010) und aufgrund der strukturellen Unterschiede des Proteins zu NgTLP nicht überprüft.

Die Expressionsstudien, die in Abschnitt 4.2 diskutiert wurden, zeigten eine signifikant erhöhte NgTLP-Transkriptmenge nach Zugabe von *D. melanogaster* in das Sekret offener *N. mirabilis*-Kannen. Dies könnte auf eine antimykotische Wirkung hinweisen, welche sich gegen Mikroorganismen richtet, die über die Beute eingeschleppt werden. Für viele TLPs wurde eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber Pilzen beschrieben, welche sich jedoch trotz der hohen Homologie der Proteinfamilie nicht gegen spezifische Pilzarten richtet. Ban-TLP, welches eine 77 %-ige Übereinstimmung mit NgTLP zeigt, wirkt nicht wachstumshemmend auf *N. crassa* oder *C. albicans* wie z.B. Zeamatin und andere TLPs, besitzt aber schwache  $\beta$ -1,3-Glucanase-Aktivität, welche erst nach drei Tagen nachweisbar ist (Barre *et al.*, 2000). Weiterhin ist nicht bekannt, ob das Thaumatin\_1-Motiv wichtig für eine biologische Aktivität ist. Bisher sind die Funktionen von drei PR-5-Proteinen bekannt, in denen dieses Motiv vorkommt. Die Expression von GmOLP aus der Sojabohne wird durch hohen Salzstress induziert und SniOLP aus *S. nigrum* sowie CkTLP aus *Cynanchum komarovii* wirken antimykotisch (Jami *et al.*, 2007; Wang *et al.*,

2011). Ob die Mutation dieses Motivs in NgTLP einen Einfluss auf dessen potentielle mykotische Aktivität bzw. Spezifität hat, muss noch untersucht werden.

#### 4.5.2 Die Chitinase aus *N. rafflesiana* (NrChit1)

Die in dieser Arbeit untersuchte Chitinase aus *N. rafflesiana* (NrChit1) wird aus 292 AS gebildet. Ähnlich dem NgTLP besitzt das Enzym ein putatives Signalpeptid am N-Terminus, welches aus 26 AS besteht und höchstwahrscheinlich für den sekretorischen Transport des Proteins in den Apoplasten und letztendlich in die Kannenflüssigkeit verantwortlich ist. Da auch dieses Protein über eine proteomische Analyse des Verdauungssekrets identifiziert wurde, ist der sekretorische Transportweg der Chitinase sehr wahrscheinlich. Bei der proteomischen Analyse des Kannensekrets wurde aus einer 30 kDa-Bande die Peptidsequenz YYDNGYSSA(I/L)K isoliert. Anhand dieser konnte über PCR die cDNA-Sequenz der Chitinase aus *N. rafflesiana*-Kannen isoliert werden. Die Peptidsequenz ist in der Primärstruktur des Proteins von <sup>279</sup>Y bis <sup>289</sup>K enthalten, wobei AS 288 ein Isoleucin ist (Stieber, 2006). Das reife NrChit1-Protein enthält das Chitinase\_18-Motiv (LDGIDFDIE) der katalytischen Domäne von Glykosid-Hydrolasen der Familie 18 (Karlsson & Stenlid, 2009) von Position 119 bis 127 (Abb. 3.11). Die AS-Sequenz von NrChit1 wies auf eine Chitinase der Klasse III hin (Collinge *et al.*, 1993) und beinhaltet die sechs konservierten Cystein-Reste, die auch häufig in Chitinasen der Klasse III anderer Pflanzenarten vorkommen (Abb. 3.24) (Kim *et al.*, 1999). Die Kristallstrukturen mehrerer dieser Enzyme konnten bereits bestimmt werden. NrChit1 wurde anhand der 3D-Struktur von Hevamine aus *Hevea brasiliensis* (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1994) modelliert und entspricht der Faltung anderer Chitinasen der Klasse III. Es bildet ein sogenanntes TIM-Barrel, ein ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-Fass, welches unter den Chitinasen der Familie 18 stark konserviert ist (Abb. 3.13).

Die für das Protein kodierende mRNA besteht aus 879 bp. Das zugehörige *NrChit1*-Gen konnte neben *N. rafflesiana* (GQ338257) aus gDNA von sieben weiteren *Nepenthes*-Arten (*N. ventricosa* (GQ338254), *N. thorelii* (GQ338255), *N. singalana* (GQ338256), *N. mirabilis* (GQ338258), *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“ (GQ338259), *N. gracilis* (GQ338260) und *N. ampullaria* (GQ338261)) kloniert werden. Die Sequenzen sind hochkonserviert und weisen teilweise eine 100 %-ige Übereinstimmung auf (Abb. 6.5). Eine phylogenetische Analyse der Sequenzen ergab einen *consensus tree* mit drei Hauptlinien. Die erste Linie enthält *N. ventricosa* und *N. mirabilis*, die zweite *N. thorelii* und eine Schwestergruppe, bestehend aus *N. rafflesiana* und *N. ampullaria*. Die dritte Linie wird von *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“ und der Schwestergruppe, welche *N. gracilis* und *N. singalana* beinhaltet, gebildet (Abb. 3.25). Phylogenetische Analysen über das Chloroplasten *trnK*-Intron in *Nepenthesaceae* ergaben drei gut gestützte *Clades*, wobei in *Clade I* alle auf Sumatra, der malaiischen Halbinsel und den übrigen auf dem südostasiatischen Festland vorkommenden Taxa enthalten sind (z.B. *N. gracilis*, *N. singalana*, *N. mirabilis*, *N. ampullaria*, *N. rafflesiana* und *N. thorelii*). Nur *N. ventricosa*, die auf den Philippinen vorkommt, ist in *Clade II* zu finden (Meimberg *et al.*, 2001; Meimberg, 2002). Die Hybride *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“ wurde in der *trnK*-Intron-Phylogenie nicht untersucht. Unsere Analysen zeigten eine nahe Verwandtschaft von *N. ventricosa* zu *N. mirabilis* mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit. Diese Gruppierung scheint aufgrund der biogeographischen Lage wahrscheinlich, da auch *N. mirabilis* auf den Philippinen vorkommt. Auch die Gruppierung von *N. gracilis* und *N. singalana* kann über die Biogeographie erklärt werden, da beide Arten auf Sumatra endemisch sind. *N. rafflesiana* und

*N. ampullaria* sind weit verbreitete Arten. Diese sind in Borneo, auf der malaiischen Halbinsel, Singapur, Sulawesi, Sumatra und Thailand zu finden (McPherson, 2010). Die hier auftretenden Unterschiede zwischen der Endochitinase- und der *trnK*-Intron-Phylogenie könnten in der Wahl des Chloroplasten-DNA- (cpDNA) Markers begründet sein. Meimberg *et al.* (2006) isolierten eine nicht funktionelle, translokalisierte Kopie (Typ B) des *trnK*-Introns, welches in fast allen *Nepenthes*-Arten zu finden ist. Diese translokalisierten cpDNA-Kopien können während der PCR co-amplifiziert werden und zu inkorrekten phylogenetischen Hypothesen führen. In neueren phylogenetischen Analysen wird das *PTR1*-Gen, welches für die Peptid-Transferase PTR1 kodiert (Schulze *et al.*, 1999), als nuklearer Marker von Nepenthaceae getestet (Meimberg & Heubl, 2006).

Ebenso wie beim *NgTLP*-Gen weisen auch diese Sequenzen keine Introns in der kodierenden Region auf. *NrChit1* ist ebenfalls kein Retrogen, da auch hier die Expression des Enzyms im Kannengewebe nachgewiesen werden konnte. Das Phänomen scheint sich aber nicht generell auf Chitinasen aus *Nepenthes*-Kannen zu beziehen, da vier für basische Chitinasen kodierende Gene (*Nkchit1b-1*, -2 & *Nkchit2b-1*, -2), die aus *N. khasiana*-Kannen isoliert wurden, aus drei Exons und zwei Introns bestehen (Eilenberg *et al.*, 2006). Es ist möglich, dass dieses Phänomen typisch für Chitinasen der Klasse III ist, da auch Gene anderer Pflanzenarten, die für dieses Enzym kodieren (*Malus domestica* (AF309514), *Medicago truncatula* (AY238969) und *Vitis vinifera* (AB105374)), ebenfalls keine Introns in der kodierenden Region besitzen.

Das in *E. coli* heterolog exprimierte *NrChit1*-Protein wurde auf chitinolytische Aktivität untersucht. Das Enzym konnte allerdings nur das polymere Substrat CM-Chitin-RBV spalten, nicht aber die kurzkettigen Substrate 4MU-(GlcNAc)<sub>1</sub>, 4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> und 4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub>. Darüber konnte gezeigt werden, dass das Enzym keine Chitobiosidase oder Exochitinase-Aktivität besitzt. Es handelt sich um eine Endochitinase, welche allerdings nur längere *N*-Acetylglucosamin-Ketten hydrolysieren kann. Eilenberg *et al.* (2006) konnte zeigen, dass Endochitinasen im Sekret von *N. khasiana*-Kannen vorkommen, die ausschließlich kolloidales Chitin hydrolysieren. CM-Chitin-RBV wurde für die biochemische Charakterisierung des Enzyms verwendet. Die höchste Aktivität konnte im sauren pH-Bereich (3,5) gemessen werden. Dies ist nicht verwunderlich, da der pH-Wert des Verdauungssekrets auf etwa 3 absinkt, sobald Beute in die Kanne fällt (An *et al.*, 2001). Das Temperatur-Optimum von *NrChit1* liegt bei 41 °C. Dies erscheint etwas hoch, jedoch zeigen die sauren Proteinasen aus *N. gracilis* ähnliche Werte. *Nepenthesin I* hat ein Temperatur-Optimum von 55 °C und *Nepenthesin II* von 45 °C. Auch diese Enzyme zeigen die höchste Aktivität im sauren pH-Bereich (Athauda *et al.*, 2004). Da *NrChit1* aus dem Kannensekret isoliert wurde, sollte auch in diesem Endochitinase-Aktivität messbar sein. CM-Chitin-RBV wurde durch Zugabe des Sekrets geschlossener und offener Kannen verschiedener Arten hydrolysiert (Abb. 3.15). Dabei war die gemessene relative Aktivität bei Verwendung des Sekrets oftmals höher, als die des rekombinanten Proteins, welche bei 0,05 (AU / µg Protein h) lag. Beim Vergleich der Aktivität des Sekrets geschlossener und offener Kannen der gleichen Art war die Aktivität in geschlossenen Kannen von *N. rafflesiana* und *N. mirabilis* höher als in offenen Kannen. Nur bei *N. thorelii* konnte eine Steigerung der Hydrolyse des Substrats in offenen Kannen verzeichnet werden. Allerdings kommen höchstwahrscheinlich weitere Chitinasen im Verdauungssekret vor, welche ebenfalls das Substrat zersetzen können. Fünf dieser Enzyme konnten bereits identifiziert werden, eine Chitinase der Klasse IV (Hatano & Hamada, 2008) sowie die basischen Chitinasen der Klasse I (*Nkchit1b-1* & -2, *Nkchit2b-1* & -2). Allerdings tragen nur *Nkchit1b-1* und -2 ein N-terminales Signalpeptid für den sekretorischen Weg in den Apoplasten. *Nkchit2b-1* und -2 besitzen eine

Sequenz am C-Terminus, die wahrscheinlich für den Transport der Enzyme in die Vakuole verantwortlich ist (Eilenberg *et al.*, 2006). Weiterhin kann die Konzentration der Endochitinase in verschiedenen Arten variieren. Es ist nur wenig darüber bekannt, ob die Verdauungsenzyme konstitutiv exprimiert werden oder induzierbar sind. Letzteres wäre für hydrolytische Enzyme wie Chitinasen wahrscheinlich, da die Beute der Kannen aus Arthropoden besteht, deren Exoskelett Chitin enthält. Eilenberg *et al.* (2006) konnten zeigen, dass die chitinolytische Aktivität des Verdauungssekrets von *N. khasiana* durch die Zugabe von Chitin ansteigt. Auch die Induzierbarkeit der sauren Endochitinase konnte über *Real-time* PCR bestätigt werden. Dabei wurde eine Zunahme der *NrChit1*-Transkriptmenge nach der Fütterung offener *N. mirabilis*-Kannen mit *D. melanogaster* im Vergleich zu nicht gefütterten Kannen gleichen Alters beobachtet.

#### 4.6 Ausblick

Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des *Thaumatin-like proteins* aus *N. gracilis* (NgTLP), welche bisher erfolglos blieb. Diese sollte weiterhin fortgeführt werden. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre die antimykotische Wirkung von NgTLP auf andere Pilzarten zu untersuchen. Diese tritt in den meisten Pflanzen-TLPs auf, ist aber trotz der hohen Homologie dieser Proteinfamilie sehr heterolog und nicht gegen bestimmte Pilzarten gerichtet. Es ist durchaus möglich, dass im Verdauungssekret aufgrund der extremen Bedingungen andere Pilze vorkommen, als in dieser Arbeit getestet wurden. Da noch keine Studien über filamentöse Pilze in der Kannenflüssigkeit vorliegen, sollte dies über molekulargenetische Analysen aufgeklärt werden. Weiterhin kann man über *Real-time* PCR mögliche Auslöser testen, welche die Expression sowohl von NgTLP und als auch der Endochitinase induzieren. Die Einführung bestimmter Mikroorganismen oder Substanzen in geschlossene Kannen könnte zeigen, ob diese zu einer Erhöhung der *NgTLP*- bzw. *NrChit1*-Transkriptmenge führen. Eventuell lassen sich so auch Aussagen über die Rolle der Proteine im Verdauungssekret treffen. Beide Proteine zeigen eine verstärkte Expression im epidermalen Gewebe und könnten neben dem Zersetzen der Beute auch eine Rolle in der Pflanzenabwehr einnehmen.

Außerdem sollte die AFLP-Methode für die Detektion kleinerer Proteine, wie sie im Kannensekret vorkommen, optimiert werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, lassen sich über das Verfahren Unterschiede im Expressionsmuster induzierter und nichtinduzierter Proben sowie verschiedener Gewebearten feststellen. Neben der Identifizierung neuer Proteine könnten gleichzeitig mögliche Induktoren getestet werden, deren Einfluss auf die Expression bestimmter Gene anschließend über *Real time* PCR überprüft werden kann.



- Adam JH.** 1997. Prey spectra of Bornean *Nepenthes* species (Nepenthaceae) in relation to their habitat. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* **20**, 121-134.
- Adamec L.** 1997. Mineral nutrition of carnivorous plants: a review. *Botanical Review* **63**, 273-299.
- Adams RM, Smith GW, An SEM.** 1977. Survey of the five carnivorous plant genera. *American Journal of Botany* **64**, 265-272.
- Adlassnig W, Peroutka M, Lendl T.** 2011. Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity, and mutualistic activities. *Annals of Botany* **107**, 181-194.
- Agrios GN.** 1978. Plant diseases caused by fungi. In: *Plant Pathology*. 2. Auflage. Academic Press, New York. 298-301.
- Amagase S.** 1972. Digestive Enzyme in Insectivorous Plants: III. Acid Proteases in the Genus *Nepenthes* and *Drosera peltata*. *The Journal of Biochemistry* **72**, 73-81.
- Amagase S, Nakayama S, Tsugita A.** 1969. Acid Protease in *Nepenthes*: II. Study on the Specificity of Nepenthesin. *The Journal of Biochemistry* **66**, 431-439.
- Amagase S, Mori M, Nakayama S.** 1972. Digestive Enzymes in Insectivorous Plants: IV. Enzymatic Digestion of Insects by *Nepenthes* Secretion and *Drosera peltata* Extract: Proteolytic and Chinolytic Activities. *The Journal of Biochemistry* **72**, 765-767.
- An CI, Fukusaki E, Kobayashi A.** 2001. Plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* **214**, 661-667.
- An CI, Fukusaki E, Kobayashi A.** 2002 Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* **215**, 472-477.
- Anderson JP, Thatcher LF, Singh KB.** 2005. Plant defence responses: conservation between models and crops. *Functional Plant Biology* **32**, 21-34.
- Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS, Van Loon LC.** 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology* **47**, 79-87.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T.** 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195-201.
- Athauda SBP, Matsumoto K, Rajapakshe S, Kuribayashi M, Kojima M, Kubomura-Yoshida N, Iwamatsu A, Shibata C, Inoue H, Takahashi K.** 2004. Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochemical Journal* **381**, 295-306.
- Aung HH, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Ahmed AA, Pare PW, Mabry TJ.** 2002. Phenolic constituents from the leaves of the carnivorous plant *Nepenthes gracilis*. *Fitoterapia* **73**, 445-447.
- Barre A, Peumans WJ, Menu-Bouaouiche L, Van Damme EJM, May GD, Fernandez Herrera A, Van Leuven F, Rougé P.** 2000. Purification and structural analysis of an abundant Thaumatin-like protein from ripe banana fruit. *Planta* **211**, 791-799.
- Barthlott W, Porembski S, Seine R, Theisen I.** 2004. Karnivoren, Biologie und Kultur fleischfressender Pflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Bauer U, Bohn HF, Federle W.** 2008. Harmless nectar source or deadly trap: *Nepenthes* pitchers are activated by rain, condensation and nectar. *Proceedings of the Royal Society* **275**, 259-265.
- Bauer U, Grafe TU, Federle W.** 2011. Evidence for alternative trapping strategies in two forms of the pitcher plant, *Nepenthes rafflesiana*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3683-3692.
- Bauer U, Willmes C, Federle W.** 2009. Effect of pitcher age on trapping efficiency and natural prey capture in carnivorous *Nepenthes rafflesiana* plants. *Annals of Botany* **103**, 1219-1226.

- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* **340**, 783-795.
- Bernier F, Berna A. 2001. Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 545-554.
- Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bock O, Kreipe H, Lehmann U. 2001. One-Step Extraction of RNA from Archival Biopsies. *Analytical Biochemistry* **295**, 117-119.
- Bohlmann H. 1994. The role of thionins in plant protection. *Critical Reviews in Plant Science* **13**, 1-16.
- Bohn HF, Federle W. 2004. Insect aquaplaning: *Nepenthes* pitcher plants capture prey with the peristome, a fully wettable water-lubricated anisotropic surface. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **101**, 14138-14143.
- Bonhomme V, Gounand I, Alaux C, Jouselin E, Barthélémy D, Gaume L. 2011(A). The plant-ant *Camponotus schmitzi* helps its carnivorous host-plant *Nepenthes bicalcarata* to catch its prey. *Journal of Tropical Ecology* **27**, 15-24.
- Bonhomme V, Pelloux-Prayer H, Jouselin E, Forterre Y, Labat J, Gaume L. 2011(B). Slippery or sticky? Functional diversity in the trapping strategy of *Nepenthes* carnivorous plants. *New Phytologist* **191**, 545-554.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brandazza A, Angeli S, Tegoni M, Cambillau C, Pelosi P. 2004. Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals. *FEBS Letters* **572**, 3-7.
- Breiteneder H. 2004. Thaumatin-like proteins-a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy* **59**, 479-481.
- Bringmann G, Rischer H, Wohlfarth M, Schlauer J, Assi LA. 2000. Droserone from cell cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and its biosynthetic origin. *Phytochemistry* **53**, 339-343.
- Bufe A, Spangfort MD, Kahlert H, Schlaak M, Becker W. 1996. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* **199**, 413-415.
- Cahoon EB, Lindqvist Y, Schneider G, Shanklin J. 1997. Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *PNAS* **94**, 4872-4877.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **37**, 233-238.
- Caporale C, Di Bernardino I, Leonardi L, Bertini L, Cascone A, Buonocore V, Caruso C. 2004. Wheat pathogenesis-related proteins of class 4 have ribonuclease activity. *FEBS Letters* **575**, 71-76.
- Chase MW, Christenhusz MJM, Sanders D, Fay MF. 2009. Murderous plants: Victorian Gothic, Darwin and modern insights into vegetable carnivory. *Botanical Journal of the London Society* **161**, 329-356.
- Chia TF, Aung HH, Osipov AN, Goh NK, Chia LS. 2004. Carnivorous pitcher plant uses free radicals in the digestion of prey. *Redox Report* **9**, 255-261.
- Chin L, Moran JA, Clarke C. 2010. Trap geometry in three giant montane pitcher plant species from Borneo is a function of tree shrew body size. *New Phytologist* **186**, 461-470.
- Christensen AB, Ho Cho B, Naesby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordeñana K, Collinge DB, Thordal-Christensen H. 2002. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* **3**, 135-144.

- Chu KT, Ng TB.** 2003. Isolation of a large thaumatin-like antifungal protein from seeds of the Kweilin chestnut *Castanopsis chinensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **301**, 364-370.
- Clarke CM.** 2001. *Nepenthes of Sumatra & Peninsular Malaysia*. Kota Kinabalu: Natural History Publications.
- Clarke CM, Bauer U, Lee CC, Tuen AA, Rembold K, Moran JA.** 2009. Tree shrew lavatories: a novel nitrogen sequestration strategy in a tropical pitcher plant. *Biology Letters* **5**, 632-635.
- Clarke CM, Kitching RL.** 1995. Swimming Ants and Pitcher Plants: A Unique Ant-Plant Interaction from Borneo. *Journal of Tropical Ecology* **11**, 589-602.
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K.** 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal* **3**, 31-40.
- Cresswell JE.** 1998. Morphological correlates of necromass accumulation in the traps of an eastern tropical pitcher plant, *Nepenthes ampullaria* Jack, and observations on the pitcher infauna and its reconstitution following experimental removal. *Oecologia* **113**, 383-90.
- Custers JHHV, Harrison SJ, Sela-Buurlage MB, Van Deventer E, Lageweg W, Howe PW, Van der Meijs PJ, Ponstein AS, Simons BH, Melchers LS, Stuiver MH.** 2004. Isolation and characterization of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. *Plant Journal* **39**, 147-160.
- Darwin C.** 1875. *Insectivorous plants*. John Murray, London.
- Dangl JL, Jones J.** 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- De Freitas CD, Lopes JL, Beltramini LM, de Oliveira RS, Oliveira JT, Ramos MV.** 2011. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. *Biochimica et Biophysica Acta* **1808**, 2501-2507.
- Dicke M, Van Poecke RMP.** 2002. Signalling in plant-insect interactions: signal transduction in direct and indirect plant defence. In: *D. Scheel & C. Wasternack Plant Signal Transduction*. 289-316.
- DiGiusto B, Grosbois V, Fargeas E, Marshall DJ, Gaume L.** 2008. Contribution of pitcher fragrance and fluid viscosity in a *Nepenthes* carnivorous plant from Borneo. *Journal of Bioscience* **33**, 121-136.
- Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AL, Simmonds DH.** 2001. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**, 297-307.
- Doyle JJ, Doyle JL.** 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Dusotoit-Coucaud A, Porcheron B, Brunel N, Kongsawadworakul P, Franchel J, Viboonjun U, Chrestin H, Lemoine R, Sakr S.** 2010. Cloning and Characterization of a New Polyol Transporter (HbPLT2) in *Hevea brasiliensis*. *Plant & Cell Physiology* **51**, 1878-1888.
- Ebel J, Mithöfer A.** 1998. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**, 335-348.
- Ellison AM, Gotelli NJ.** 2009. Energetics and the evolution of carnivorous plants - Darwin's "most wonderful plants in the world". *Journal of Experimental Botany* **60**, 19-42.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Rahamim Y, Sionov E, Segal E, Carmeli S, Zilberstein A.** 2010. Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* **61**, 911-922.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Schuster S, Movtchan A, Zilberstein A.** 2006. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2775-2784.
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA.** 1996. Laser Capture Microdissection. *Science* **274**, 998-1001.

- Epple P, Apel K, Bohlmann H.** 1995. An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* **109**, 813-820.
- Fell JW, Scorzetti G.** 2004. Reassignment of the basidiomycetous yeasts *Trichosporon pullulans* to *Guehomyces pullulans* gen. nov., comb. nov. and *Hyalodendron lignicola* to *Trichosporon lignicola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 995-998.
- Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, Goesaert H, Brijs K, Beaugrand J, Volckaert G, Van Campenhout S, Proost P, Courtin CM, Delcour JA.** 2007. TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. *Biochemical Journal* **403**, 583-591.
- Fierens E, Gebruers K, Voet AR, De Maeyer M, Courtin CM, Delcour JA.** 2009. Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **24**, 646-654.
- Fliegmann J, Mithöfer A, Wanner G, Ebel J.** 2004. An Ancient Enzyme Domain Hidden in the Putative  $\beta$ -Glucan Elicitor Receptor of Soybean May Play an Active Part in the Perception of Pathogen-associated Molecular Patterns during Broad Host Resistance. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 1132-1140.
- Fliegmann J, Montel E, Djulić A, Cottaz S, Driguez H, Ebel J.** 2005. Catalytic properties of the bifunctional soybean  $\beta$ -glucan-binding protein, a member of family 81 glycoside hydrolases. *FEBS Letters* **579**, 6647-6652.
- Fukuchi-Mizutani M, Tasaka Y, Tanaka Y, Ashikari T, Kusumi T, Murata N.** 1998. Characterization of  $\Delta 9$  Acyl-lipid Desaturase Homologues from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **39**, 247-253.
- García-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M.** 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer-proteins in plants. *Trends in Microbiology* **3**, 72-74.
- Gaume L, DiGiusto B.** 2009. Adaptive significance and ontogenetic variability of the waxy zone in *Nepenthes rafflesiana*. *Annals of Botany* **104**, 1281-1291.
- Gaume L, Gorb S, Rowe N.** 2002. Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers. *New Phytologist* **156**, 479-489.
- Gaume L, Perret P, Gorb E, Gorb S, Labat J, Rowe N.** 2004. How do plant waxes cause flies to slide? Experimental tests of wax-based trapping mechanisms in three pitfall carnivorous plants. *Arthropod Structure & Development* **33**, 103-111.
- Gaume L, Forterre Y.** 2007. A viscoelastic deadly fluid in carnivorous pitcher plants. *PLoS ONE* **2**, e1185.
- Ghosh R, Chakrabarti C.** 2008. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. *Planta* **228**, 883-890.
- Gómez-Leyva JF, Blanco-Labra A.** 2001. Bifunctional  $\alpha$ -amylase/Trypsin inhibitor activity previously ascribed to the 22 kDa TL protein, resided in a contaminant protein of 14 kDa. *Journal of Plant Physiology* **158**, 177-183.
- Gorb E, Kastner V, Peressadko A, Arzt E, Gaume L, Rowe N, Gorb S.** 2004. Structure and properties of the glandular surfaces in the digestive zone of the pitcher in the carnivorous plant *Nepenthes ventrata* and its role in insect trapping and retention. *Journal of Experimental Biology* **207**, 2947-2963.
- Gorb EV, Gorb SN.** 2006. Physicochemical properties of functional surfaces in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco (Nepenthaceae). *Plant Biology* **8**, 841-848.
- Goubert F, Jackson P, Deery MJ, Dupree P.** 2002. Polysaccharide Analysis Using Carbohydrate Gel Electrophoresis: A Method to Study Plant Cell Wall Polysaccharides and Polysaccharide Hydrolases. *Analytical Biochemistry* **300**, 53-68.
- Grafe TU, Schöner CR, Kerth G, Junaidi A, Schöner MG.** 2011. A novel resource-service mutualism between bats and pitcher plants. *Biology Letters* doi: 10.1098/rsbl.2010.1141.
- Green TR, Ryan CA.** 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* **175**, 776-777.

- Greenberg JT, Yao N.** 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**, 201-211.
- Greenwood M, Clarke C, Lee CC, Gunsalam A, Clarke RH.** 2011. A Unique Resource Mutualism between the Giant Bornean Pitcher Plant, *Nepenthes rajah*, and Members of a Small Mammal Community. *PLOS one* **6**, doi:10.1371/journal.pone.0021114.
- Grenier J, Potvin C, Asselin A.** 2000. Some fungi express  $\beta$ -1,3-glucanases similar to thaumatin-like proteins. *Mycologia* **92**, 841-848.
- Grenier J, Potvin C, Trudel J, Asselin A.** 1999. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric  $\beta$ -1,3-glucans. *Plant Journal* **19**, 473-480.
- Groot AT, Estock ML, Horovitz JL, Hamilton J, Santangelo RG, Schal C, Gould F.** 2009. QTL analysis of sex pheromone blend differences between two closely related moths: Insight into divergence in biosynthetic pathways. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**, 568-577.
- Guex N, Peitsch MC.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Guisande C, Granado-Lorencio C, Andrade-Sossa C, Roberto Duque SR.** 2007. Bladderworts. *Functional Plant Science and Biotechnology* **1**, 58-68.
- Gusakov AV.** 2010. Proteinaceous Inhibitors of Microbial Xylanases. *Biochemistry (Moscow)* **75**, 1185-1199.
- Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosahl S.** 2006. The Role of Salicylic Acid and Jasmonic Acid in Pathogen Defence. *Plant Biology* **8**, 307-313.
- Harborne JB.** 1988. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press Limited.
- Hatfield RD, Ralph J, Grabber JH.** 1999. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 403-407.
- Hartmeyer I, Hartmeyer S.** 2007. Ratz fatz aus die Maus! *DAS TAUBLATT* **2**, 31-36.
- Hartmeyer I, Hartmeyer S.** 2009. Die Truncata lässt das Mäusen nicht! *DAS TAUBLATT* **1**, 40-50.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T.** 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**, 160-174.
- Hatano N, Hamada T.** 2008. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* **7**, 809-816.
- Henrissat B.** 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* **280**, 309-316.
- Henrissat B, Bairoch A.** 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* **293**, 781-788.
- Heslop-Harrison Y.** 1975. Enzyme release in carnivorous plants. *Frontiers in Biology* **43**, 525-578.
- Heubl G, Bringmann G, Meimberg H.** 2006. Molecular phylogeny and character evolution of carnivorous plant families in Caryophyllales-revisited. *Plant Biology* **8**, 821-830.
- Higashi S, Nakashima A, Ozaki H, Abe M, Uchiumi T.** 1993. Analysis of Feeding Mechanism in a Pitcher of *Nepenthes hybrida*. *Journal of Plant Research* **106**, 47-54.
- Hoffmann-Sommergruber K.** 2002. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemistry Society Transactions* **30**, 930-935.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F.** 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**, 754-755.
- Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lu G.** 2003. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* **133**, 170-181.
- Ito T & Wagner G.** 2004. Using codon optimization, chaperone co-expression, and rational mutagenesis for production and NMR assignments of human eIF2 $\alpha$ . *Journal of Biomolecular NMR* **28**, 357-367.

- Jami SK, Swathi Anuradha T, Guruprasad L, Kirti PB. 2007. Molecular, biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*). *Journal of Plant Physiology* **164**, 238-252.
- Jentsch J. 1972. Enzymes from carnivorous plants (*Nepenthes*): Isolation of the protease Nepenthacin. *FEBS Letters* **21**, 273-276.
- Jentsch J, Meierkord S, Hammer M. 1989. The Enzymes from Carnivorous Plants *Nepenthes* Properties and Characterization of the Acid Protease Nepenthacin. *Planta Medica* **55**, 227.
- Jez JM, Ferrer J, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP. 2000. Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890-902.
- Jordá L, Conejero V, Vera P. 2000. Characterization of *P69E* and *P69F*, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. *Plant Physiology* **122**, 67-73.
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DH. 1989. The carnivorous plants. London: Academic Press.
- Kandror O, Sherman M, Moerschell R, Goldberg AL. 1997. Trigger Factor Associates with GroEL *in Vivo* and Promotes Its Binding to Certain Polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 1730-1734.
- Kandror O, Sherman M, Rhode M, Goldberg AL. 1995. Trigger factor is involved in GroEL-dependent protein degradation in *Escherichia coli* and promotes binding of GroEL to unfolded proteins. *The EMBO Journal* **14**, 6021-6027.
- Karlsson M, Stenlid J. 2009. Evolution of family 18 glycoside hydrolases: Diversity, domain structures and phylogenetic relationships. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **16**, 208-223.
- Kasprzewska A. 2003. Plant Chitinases - Regulation and Function. *Cellular & Molecular Biology Letters* **8**, 809-824.
- Kato M, Hotta M, Tamin R, Itino T. 1993. Inter- and intra-specific variation in prey assemblages and inhabitant communities in *Nepenthes* pitchers in Sumatra. *Tropical Zoology* **6**, 11-25.
- Kessler A, Baldwin IT. 2002. Plant Responses to Insect Herbivory: The Emerging Molecular Analysis. *Annual Reviews of Plant Biology* **53**, 299-328.
- Kim MG, Lee KO, Cheong NE, Choi YO, Jeong JH, Cho MJ, Kim SC, Lee SY. 1999. Molecular cloning and characterization of a class III chitinase in pumpkin leaves, which strongly binds to regenerated chitin affinity gel. *Plant Science* **147**, 157-163.
- Kitajima S, Sato F. 1999. Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* **125**, 1-8.
- Klepek YS, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N. 2005. Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates H<sup>+</sup>-Symport of Numerous Substrates, Including myo-Inositol, Glycerol, and Ribose. *The Plant Cell* **17**, 204-218.
- Koiwa H, Kato H, Nakatsu T, Oda J, Yamada Y, Sato F. 1997. Purification and Characterization of Tobacco Pathogenesis-Related Protein PR-5d, an Antifungal Thaumatin-like Protein. *Plant Cell Physiology* **38**, 783-791.
- Koiwa H, Kato H, Nakatsu T, Oda J, Yamada Y, Sato F. 1999. Crystal Structure of Tobacco PR-5d Protein at 1.8 Å Resolution Reveals a Conserved Acidic Cleft Structure in Antifungal Thaumatin-like Proteins. *Journal of Molecular Biology* **286**, 1137-1145.
- Kolattukudy PE. 2005. Cutin from Plants. Biopolymers Online. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Online Library.
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothstein S. 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **84**, 7542-7546.

- Laguna L, Casado CG, Heredia A.** 1999. Flavonoid biosynthesis in tomato fruit cuticles after in vivo incorporation of  $^3\text{H}$ -phenylalanine precursor. *Physiologia Plantarum* **105**, 491-498.
- Lämmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lan KL, Zhong H, Nanamori M, Neubig RR.** 2000. Rapid Kinetics of Regulator of G-protein Signaling (RGS)-mediated  $\text{G}\alpha_i$  and  $\text{G}\alpha_o$  Deactivation. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 33497-33503.
- Lan X, Zhang X, Kodaira R, Zhou Z, Shimosaka M.** 2008. Gene Cloning, Expression, and Characterization of a Second  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase from the Chitinolytic Bacterium *Aeromonas hydrophila* Strain SUWA-9. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* **72**, 492-498.
- Lay FT, Anderson MA.** 2005. Defensins - components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science* **6**, 85-101.
- Lehmann U, Kreipe H.** 2006. Laser-assisted Microdissection and isolation of DNA and RNA. *Methods in Molecular Medicine* **120**, 65-75.
- Leone P, Menu-Bouaouiche L, Peumans WJ, Payan F, Barre A, Roussel A, Van Damme EJM, Rougé P.** 2006. Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit Thaumatin-like protein at 1.7-Å. *BIOCHIMIE* **88**, 45-52.
- Li H, Greene LH.** 2010. Sequence and Structural Analysis of the Chitinase Insertion Domain Reveals Two Conserved Motifs Involved in Chitin-Binding. *PLoS ONE* **5**, e8654.
- Liu WH, Saint DH.** 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry* **302**, 52-59.
- Liu J, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM.** 2010. The superfamily of Thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports* **29**, 419-436.
- Liu Q, Xue Q.** 2006. Computational identification of novel *PR-1*-type genes in *Oryza sativa*. *Journal of Genetics* **85**, 193-198.
- Lloyd FE.** 1942 The carnivorous plants. New York: Ronald Press.
- Lüttge U.** 1964. Untersuchungen zur Physiologie der Carnivoren Drüsen. I. Die an den Verdauungsvorgängenbeteiligten Enzyme. *Planta* **63**, 103-117.
- MacFarlane JM.** 1893. Observations on pitched insectivorous plants (part II) *Annual Botany* **7**, 403-441.
- Masuda T, Ohta K, Tani F, Mikami B, Kitabatake N.** 2011. Crystal structure of the sweet-tasting protein Thaumatin II at 1.27 Å. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **410**, 457-460.
- Matthews REF.** 1960. A ribonuclease from *Nepenthes* spp. *Biochimica et Biophysica Acta* **38**, 552-553.
- McPherson S.** 2009. Pitcher plants of the Old World. Redfern Natural History Productions, Poole.
- McPherson S.** 2010. Carnivorous plants and Their Habitats, Vol. 1. Poole, UK: Redfern Natural History Productions.
- Meimberg H.** 2002. Molekular-systematische Untersuchungen an den Familien Nepenthaceae und Ancistrocladaceae sowie verwandter Taxa aus der Unterklasse Caryophyllidae s. I. Doktorarbeit. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Meimberg H, Heubl G.** 2006. Introduction of a Nuclear Marker for Phylogenetic Analysis of Nepenthaceae. *Plant Biology* **8**, 831-840.
- Meimberg H, Thalhammer S, Brachmann A, Heubl G.** 2006. Comparative analysis of a translocated copy of the *trnK* intron in carnivorous family Nepenthaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**, 478-490.
- Meimberg H, Wistuba A, Dittrich P, Heubl G.** 2001. Molecular Phylogeny of Nepenthaceae Based on Cladistic Analysis of Plastid *trnK* Intron Sequence Data. *Plant Biology* **3**, 164-175.

- Melchers LS, Apotheker-de Groot M, Van der Knaap JA, Ponstein AS, Sela-Buurlage MB, Bol JF, Cornelissen BJC, Van den Elzen PJM, Linthorst HJM. 1994. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant Journal* **5**, 469-480.
- Merbach MA, Merbach DJ, Maschwitz U, Booth WE, Fiala B, Zizka G. 2002. Mass march of termites into the deadly trap. *Nature* **415**, 37.
- Merbach MA, Zizka G, Fiala B, Merbach D, Maschwitz U. 1999. Giant nectaries in the peristome thorns of the pitcher plant *Nepenthes bicalcarata* Hooker f. (Nepenthaceae): anatomy and functional aspects. *Ecotropica* **5**, 45-50.
- Métraux JP, Streit L, Staub Th. 1988. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **33**, 1-9.
- Mithöfer A. 2011. Carnivorous pitcher plants: Insights in an old topic. *Phytochemistry* **72**, 1678-1682.
- Mithöfer A, Boland W, Maffei ME. 2009. Chemical ecology of plant-insect interactions. In: Molecular aspects of plant disease resistance. J. Parker, ed., Wiley-Blackwell, *Annual Plant Review* **34**, 261-291.
- Mogk A, Mayer MP, Deuerling E. 2002. Mechanisms of Protein Folding: Molecular Chaperones and Their Application in Biotechnology. *ChemBioChem* **3**, 807-814.
- Moran JA. 1993. The effect of pitcher wing removal on prey capture by pitcher plant *Nepenthes rafflesiana*. *Brunei Museum Journal* **8**, 81-82.
- Moran JA. 1996. Pitcher dimorphism, prey composition and the mechanisms of prey attraction in the pitcher plant *Nepenthes rafflesiana* in Borneo. *Journal of Ecology* **84**, 515-525.
- Moran JA, Hawkins BJ, Gowen BE, Robbins SL. 2010. Ion fluxes across the pitcher walls of three Bornean *Nepenthes* pitcher plant species: flux rates and gland distribution patterns reflect nitrogen sequestration strategies. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1365-1374.
- Moran JA, Booth WE, Charles JK. 1999. Aspects of Pitcher Morphology and Spectral Characteristics of Six Bornean *Nepenthes* Pitcher Plant Species: Implications for Prey Capture. *Annals of Botany* **83**, 521-528.
- Moran JA, Clarke CM, Hawkins BJ. 2003. From carnivore to detritivore? Isotopic evidence for leaf litter utilization by the tropical pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *International Journal of Plant Sciences* **164**, 635-639.
- Moran JA, Clarke CM. 2010. The carnivorous syndrome in *Nepenthes* pitcher plants. *Plant Signal Behavior* **5**, 644-648.
- Morohoshi T, Oikawa M, Sato S, Kikuchi N, Kato N, Ikeda T. 2011. Isolation and characterization of novel lipases from a metagenomic library of the microbial community in the pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes hybrid*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* doi:10.1016/j.jbiosc.2011.06.010.
- Narasimhan ML, Damsz B, Coca MA, Ibeas JI, Yun D, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA. 2001. A Plant Defense Response Effector Induces Microbial Apoptosis. *Molecular Cell* **8**, 921-930.
- Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. 1998. Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1694-1699.
- Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. 2000. Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 884-889.
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**, 249-266.
- Okushima Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 2000. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* **42**, 479-488.



- Owen TP, Jr., Lennon, K.A. 1999. Structure and development of the pitchers from the carnivorous plant *Nepenthes alata* (Nepenthaceae). *American Journal of Botany* **86**, 1382-1390.
- Owen TP, Jr., Lennon KA, Santo MJ, Anderson AN. 1999. Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Annals of Botany* **84**, 459-466.
- Park C, Kim K, Shin R, Park JM, Shin Y, Paek K. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant Journal* **37**, 186-198.
- Passardi F, Penel C, Dunand C. 2004. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* **9**, 534-40.
- Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV. 2000. Chitinolytic enzymes: An exploration. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 473-483.
- Pavlovič A, Slováková L, Šantrůček J. 2011. Nutritional benefit from leaf litter utilization in the pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *Plant, Cell & Environment* doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02382.x.
- Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S. 2011. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *BMC Plant Biology* doi: 10.1186/1471-2229-11-33.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**, E36.
- Plachno BJ, Ademic L, Lichtscheidl IK, Peroutka M, Adlassnig W, Vrba J. 2006. Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. *Plant Biology* **8**, 813-820.
- Raj G, Kurup R, Hussain AA, Baby A. 2011. Distribution of naphthoquinones, plumbagin, droserone, and 5-O-methyl droserone in chitin-induced and uninduced *Nepenthes khasiana*: molecular events in prey capture. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/err219.
- Rathjen JP, Moffett P. 2003. Early signal transduction events in specific plant disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 300-306.
- Riedel M, Eichner A, Jetter R. 2003. Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta* **218**, 87-97.
- Riedel M, Eichner A, Meimberg H, Jetter R. 2007. Chemical composition of epicuticular wax crystals on the slippery zone in pitchers of five *Nepenthes* species and hybrids. *Planta* **225**, 1517-1534.
- Rischer H, Hamm A, Bringmann G. 2002. *Nepenthes insignis* uses a C2-portion of the carbon skeleton of L-alanine acquired via its carnivorous organs, to build up the allelochemical plumbagin. *Phytochemistry* **59**, 603-609.
- Roberts W, Selitrennikoff CP. 1990. Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology* **136**, 1771-1778.
- Rott M. 2009. Untersuchungen des Verdauungssekrets und Klonierung eines PR-1 Proteins aus *Nepenthes*-Kannen. Diplomarbeit. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Rottloff S. 2006. Proteinanalyse des Verdauungssekrets von *Nepenthes* sp. Diplomarbeit. Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Rottloff S, Müller U, Kilper R, Mithöfer A. 2009. Micropreparation of single secretory glands from the carnivorous plant *Nepenthes*. *Analytical Biochemistry* **394**, 135-137.
- Rottloff S, Stieber R, Maischak H, Turini FG, Heubl G, Mithöfer A. 2011. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/err173.
- Roy SW, Penny D. 2007. Patterns of Intron Loss and Gain in Plants: Intron Loss-Dominated Evolution and Genome-Wide Comparison of *O. sativa* and *A. thaliana*. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 171-181.

- Sambrook J, Russell DW.** 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuelson J.** 2011. Bacterial Systems in Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation, 1. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Sakamoto Y, Watanabe H, Nagai M, Nakade K, Takahashi M, Sato T.** 2006. Lentinula edodes tlg1 encodes a thaumatin-like protein that is involved in Lentinan degradation and fruiting body senescence. *Plant Physiology* **141**, 793-801.
- Schimoler-O'Rourke R, Richardson M, Selitrennikoff CP.** 2001. Zeamatin Inhibits Trypsin and  $\alpha$ -Amylase Activities. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2365-2366.
- Schlicke M, Brakmann S.** 2005. Expression and purification of histidine-tagged bacteriophage T7 DNA polymerase. *Protein Expression & Purification* **39**, 247-253.
- Scholz I, Bückins M, Dolge L, Erlinghagen T, Weth A, Hischen F, Mayer J, Hoffmann S, Riederer M, Riedel M, Baumgartner W.** 2010. Slippery surfaces of pitcher plants: *Nepenthes* wax crystals minimize insect attachment via microscopic surface roughness. *The Journal of Experimental Biology* **213**, 1115-1125.
- Schulze W, Frommer WB, Ward JM.** 1999. Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *The Plant Journal* **17**, 637-646.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC.** 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* **31**, 3381-3385.
- Schwert GW, Takenaka Y.** 1955. A spectrophotometric determination of Trypsin and chymotrypsin. *Biochimica et Biophysica Acta* **16**, 570-575.
- Sheck AL, Groot AT, Ward CM, Gemenio C, Wang J, Brownie C, Schal C, Gould F.** 2006. Genetics of sex pheromone blend differences between *Heliothis virescens* and *Heliothis subflexa*: a chromosome mapping approach. *Journal of Evolutionary Biology* **19**, 600-617.
- Shivas RG, Brown JF.** 1989. Yeast associated with fluid in pitchers of *Nepenthes*. *Mycological Research* **93**, 96-100.
- Slootstra JW, De Geus P, Haas H, Verrips CT, Meloen RH.** 1995. Possible Active Site of the Sweet-Tasting Protein Thaumatin. *Chemical Senses* **20**, 535-543.
- Slusarenko AJ, Fraser RSS, Van Loon LC.** 2000. Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Dordrecht: Kluwer.
- Shatters RG, Jr., Boykin LM, Lapointe SL, Hunter WB, Weathersbee AA, 3<sup>rd</sup>.** 2006. Phylogenetic and structural relationships of the PR5 gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa. *Journal of Molecular Evolution* **63**, 12-29.
- Sitte P, Weiler EW, Kadereit JW, Bresinsky A, Körner C.** 2002. Strasburger, Lehrbuch der Botanik, 35. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K.** 1986. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **83**, 2427-2430.
- Sørensen HP, Mortensen KK.** 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **115**, 113-128.
- Smole U, Bublin M, Radauer C, Ebner C, Breiteneder H.** 2008. Mal d 2, the thaumatin-like allergen from apple, is highly resistant to gastrointestinal digestion and thermal processing. *International Archives of Allergy and Immunology* **147**, 289-298.
- Steckelberg R, Lüttge U, Weigl J.** 1967. Reinigung der Proteinase aus *Nepenthes*-Kannensaft. *Planta* **76**, 238-241.
- Stephenson P, Hogan J.** 2006. Cloning and characterization of a ribonuclease, a Cystein proteinase, and an aspartic proteinase from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes ventricosa* Blanco. *International Journal of Plant Science* **167**, 239-248.

- Stieber R.** 2006. Klonierung einer Chitinase cDNA aus der karnivoren Pflanze *Nepenthes rafflesiana*. Diplomarbeit. Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie der Fachhochschule, Jena.
- Swofford DL.** 2003. *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony*. Version 4.0b10 for 32-bit Microsoft Windows. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, USA.
- Tachi H, Fukuda-Yamada K, Kojima T, Shiraiwa M, Takahara H.** 2009. Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 73-79.
- Thatcher LF, Anderson JP, Singh KB.** 2005. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology* **32**, 1-19.
- Takahashi K, Athauda SBP, Matsumoto K, Rajapakshe S, Kuribayashi M, Kojima M, Kubomura-Yoshida N, Iwamatsu A, Shibata C, Inoue H.** 2005. Nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases: Enzymatic and structural characteristics. *Current Protein & Peptide Science* **6**, 513-525.
- Terras FRG, Schoofs H, De Bolle MFC, Van Leuven F, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF.** 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 15301-15309.
- Terwisscha van Scheltinga AC, Kalk KH, Beintema JJ, Dijkstra BW.** 1994. Crystal structures of hevin, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure* **2**, 1181-1189.
- Thomma BPHJ, Cammue BPA, Thevissen K.** 2002. Plant defensins. *Planta* **216**, 193-202.
- Thordal-Christensen H.** 2003. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 351-357.
- Thornhill AH, Harper IS, Hallam ND.** 2008. The development of the digestive glands and enzymes in the pitchers of three nepenthes species: *N. alata*, *N. tobaica*, and *N. ventricosa* (Nepenthaceae). *International Journal of Plant Sciences* **169**, 615-624.
- Trudel J, Grenier J, Potvin C, Asselin A.** 1998. Several thaumatin-like proteins bind to  $\beta$ -1,3-glucans. *Plant Physiology* **118**, 1431-1438.
- Van den Berg B, Ellis RJ, Dobson CM.** 1999. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *The EMBO Journal* **18**, 6927-6933.
- Van den Berg N, Crampton BG, Hein I, Birch PRJ., Berger DK.** 2004. High-throughput screening of suppression subtractive hybridization cDNA libraries using DNA microarray analysis. *BioTechniques* **37**, 818-824.
- Van der Wel H, Loewe K.** 1972. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *European Journal of Biochemistry* **31**, 221-225.
- Van Loon LC.** 1982. Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. In: Active Defense Mechanisms in Plants (R.K.S. Wood, ed.), *Plenum Press, New York, USA*, 247-273.
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V.** 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**, 245-264.
- Van Loon LC, Van Strien EA.** 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 85-97.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ.** 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 135-162.
- Vera P, Conejero V.** 1988. Pathogenesis-related proteins of tomato. P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology* **87**, 58-63.
- Vigers AJ, Roberts WK, Selitrennikoff CP.** 1991. A New Family of Plant Antifungal Proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 315-323.

- Vigers AJ, Wiedemann S, Roberts WK, Legrand M, Selitrennikoff CP, Fritig B. 1992. Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science* **83**, 155-161.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Wang Q, Li F, Zhang X, Zhang Y, Hou Y, Zhang S, Wu Z. 2011. Purification and Characterization of a CkTLP Protein from *Cynanchum komarovii* Seeds that Confers Antifungal Activity. *PLoS ONE* doi:10.1371/journal.pone.0016930.
- Wang L, Zhou Q, Zheng, Xu S. 2009. Composite structure and properties of the pitcher surface of the carnivorous plant *Nepenthes* and its influence on the insect attachment system. *Progress in Natural Science* **19**, 1657-1664.
- Wang W, Zheng H, Fan C, Li J, Shi J, Cai Z, Zhang G, Liu D, Zhang J, Vang S, Lu Z, Wong GK, Long M. 2006. High Rate of Chimeric Gene Origination by Retroposition in Plant Genoms. *The Plant Cell* **18**, 1791-1802.
- Wei Y, Zhang Z, Andersen CH, Schmelzer E, Gregersen PL, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V, Thordal-Christensen H. 1998. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* **36**, 101-112.
- Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**, 681-692.
- Zhang Z, Collinge DB, Thordal-Christensen H. 1995. Germin-like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Journal* **8**, 139-145.
- Zhu Z, Zhang Y, Long M. 2009. Extensive Structural Renovation of Retrogenes in the Evolution of the *Populus* Genome. *Plant Physiology* **151**, 1943-1951.

## Zusätzliche experimentelle Daten

Tabelle 6.1 Übersicht der hergestellten Plasmide.

Bezeichnung	Donor-Plasmid	Insert/Größe	addierte Schnittstellen	Charakteristika
pSR-6	pCR®-Blunt II-TOPO®	NgTLP, 678 bp	/	vollständige NgTLP-cDNA
pSR-7	pQE-30	NgTLP, 690 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	N-term. 6xHis-Tag, mit SP
pSR-8	pQE-30	NgTLP, 621 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	N-term. 6xHis-Tag, ohne SP
pSR-10	pHIS-8-3	NgTLP, 621 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	N-term. 8xHis-Tag, ohne SP
pSR-11	pCR®-Blunt II-TOPO®	NgTLP, 690 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	mit SP, ohne SC
pSR-12	pCR®-Blunt II-TOPO®	NgTLP, 690 bp	<i>Bam</i> HI	mit SP, ohne SC
pSR-13	pCR®-Blunt II-TOPO®	NgTLP, 621 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	ohne SP, ohne SC
pSR-14	pCR®-Blunt II-TOPO®	NgTLP, 694 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	mit SP, RV, mit SC
pSR-15	pCR®-Blunt II-TOPO®	NgTLP, 691 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	mit SP, RV, ohne SC
pSR-16	pCR®-Blunt II-TOPO®	NgTLP, 625 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	ohne SP, RV, mit SC
pSR-17	pCR®-Blunt II-TOPO®	NgTLP, 622 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	ohne SP, RV, ohne SC
pSR-18	pET-28b	NgTLP, 691 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	N/C-term. 6xHis-Tag, mit SP
pSR-19	pET-29b	NgTLP, 691 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	C-term. 6xHis-Tag, mit SP
pSR-20	pET-28b	NgTLP, 691 bp	<i>Bam</i> HI	N/C-term. 6xHis-Tag, mit SP
pSR-21	pET-28b	NgTLP, 622 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	N/C-term. 6xHis-Tag, ohne SP
pSR-22	pET-29b	NgTLP, 691 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	C-term. 6xHis-Tag, mit SP
<b>pSR-28</b>	<b>pQE-70</b>	<b>NgTLP, 621 bp</b>	<b><i>Bam</i>HI</b>	<b>C-term. 6xHis-Tag, ohne SP</b>
<b>pSR-30</b>	<b>pQE-16</b>	<b>NgTLP, 621 bp</b>	<b><i>Bam</i>HI</b>	<b>C-term. 6xHis-Tag, ohne SP</b>
pChit	pCR®-Blunt II-TOPO®	NrChit1, 879 bp	/	vollständige NrChit1-cDNA
pRS-1	pCR®-Blunt II-TOPO®	NrChit1, 894 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	mit SP, mit SC
pRS-2	pCR®-Blunt II-TOPO®	NrChit1, 894 bp	<i>Bam</i> HI	mit SP, mit SC
pRS-3	pCR®-Blunt II-TOPO®	NrChit1, 816 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	ohne SP, ohne SC
pRS-4	pCR®-Blunt II-TOPO®	NrChit1, 819 bp	<i>Bam</i> HI	ohne SP, mit SC
pRS-5	pCR®-Blunt II-TOPO®	NrChit1, 891 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	mit SP, ohne SC
<b>pRS-6</b>	<b>pHIS-8-3</b>	<b>NrChit1, 819 bp</b>	<b><i>Bam</i>HI</b>	<b>N-term. 8xHis-Tag, ohne SP</b>
pSR-9	pQE-30	NrChit1, 894 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	N-term. 6xHis-Tag, mit SP
pRS-13	pQE-30	NrChit1, 819 bp	<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III	N-term. 6xHis-Tag, ohne SP

SP: Signalpeptid, SC: Stop-Codon, RV: Leserasterverschiebung. Verwendete Expressionsplasmide sind fett dargestellt.

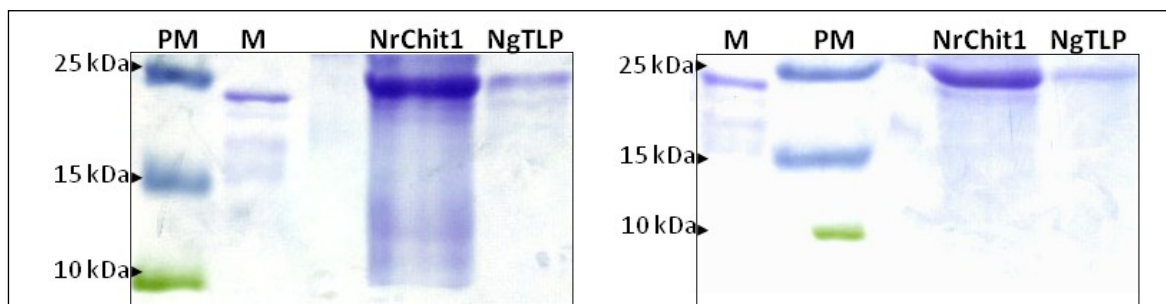
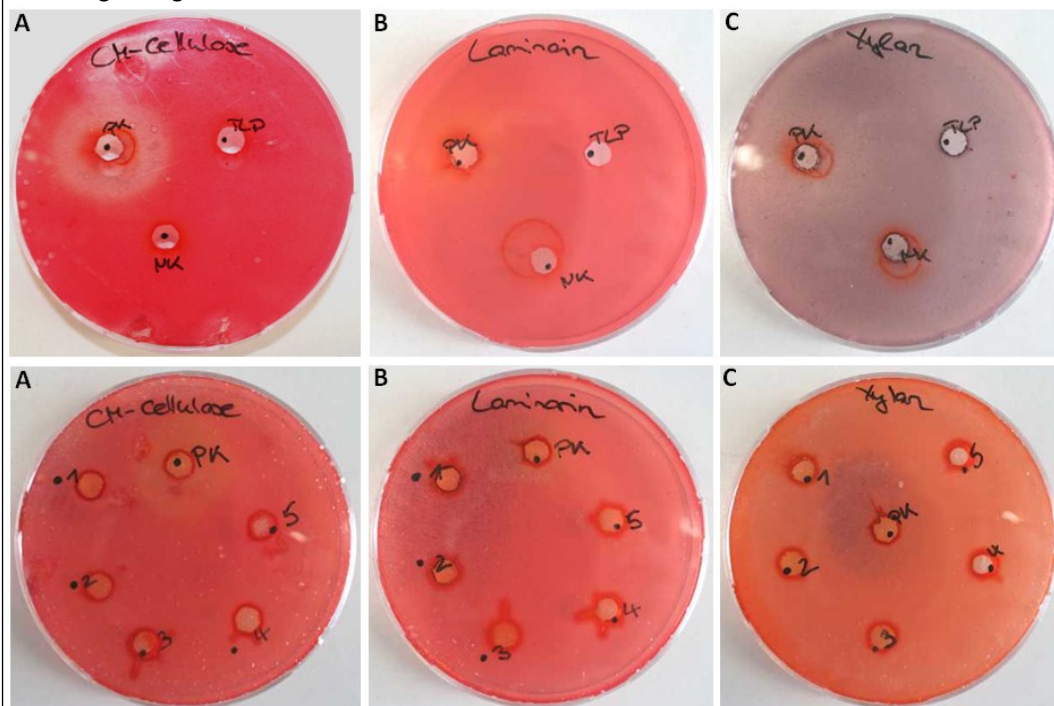


Abbildung 6.1 Laufverhalten von NrChit1 und NgTLP unter nativen und denaturierten Bedingungen.

Links ist ein natives und rechts ein SDS-Gel dargestellt. Beide Proteine laufen bei etwa 25 kDa und scheinen Monomere zu sein. **PM** PageRuler™ prestained (Fermentas), **M** Broad Range Protein Marker (Biorad).

Abbildung 6.2 Ergebnis des Substrat-Platten-Tests.



**Oben:** Vorversuch mit 50 µl NgTLP in Elutionspuffer. **Unten:** NgTLP wurde mit einem 50 mM Natriumacetat-Puffer verschiedener pH-Werte im sauren Bereich 1:5 verdünnt (1 3,5; 2 4,0; 3 4,5; 4 5,0; 5 5,5). **A** CM-Cellulose, **B** Laminarin, **C** Xylan.

GQ338252	ATGAGCCAATTCATAAAATTCATTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCCTATTGTCGATA	60
GQ338253	ATGAGCCAATTCATAAAATTCATTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCCTATTGTCGATA	60
GQ338250	ATGAGCCAATTCATAAAATTCATTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCCTATTGTCGATA	60
GQ338249	ATGAGCCAATTCATAAAATTCATTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCCTATTGTCGATA	60
GQ338251	ATGAGCCAATTCATAAAATTCATTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCCTATTGTCGATA	60
GQ338248	ATGAGCCAATTCATAAAATTCATTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCCTATTGTCGATA	60
GQ338247	ATGAGCCAATTCATAAAATTCATTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCCTATTGTCGATA	60
GQ338246	ATGAGCCAATTCATAAAATTCATTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCCCTATTGTCGATA	60
	*****	
GQ338252	TCCATCGATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACAACGTGGCTATACGGTCTGGGCAGCT	120
GQ338253	TCCATCGATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACAACGTGGCTATACGGTCTGGGCAGCT	120
GQ338250	TCCATCGATGCGGCCACATTTGATATCGTAAACAACGTGGCTATACGGTCTGGGCAGCT	120
GQ338249	TCCATCGATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACAACGTGGCTATACGGTCTGGGCAGCT	120
GQ338251	TCCATCGATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACAACGTGGCTATACGGTCTGGGCAGCT	120
GQ338248	TCCATCGATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACAACGTGGCTATACGGTCTGGGCAGCT	120
GQ338247	TCCATCGATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACAACGTGGCTATACGGTCTGGGCAGCT	120
GQ338246	TCCATCGATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACAACGTGGCTATACAGTCTGGGCAGCT	120
	*****	
GQ338252	GCCTCACCGGGCGGCGGCCAACAATTGGACCCAGGCCAGACTTGGAGCATAAAATATTAAT	180
GQ338253	GCCTCACCGGGCGGCGGCCAACAATTGGACCCAGGCCAGACTTGGAGCATAAAATATTAAT	180
GQ338250	GCCTCACCGGGCGGCGGCCAACAATTGGACCAAGGCCAGACTTGGACCATAAATGTTAAT	180
GQ338249	GCCTCACCGGGCGGCGGCCAACAATTAAACCCAGGCCAGACTTGGACCATAAATGTTAAT	180
GQ338251	GCCTCACCGGGCGGCGGCCAACAATTGAACCCAGGCCAGACTTGGACCATAAATGTTAAT	180
GQ338248	GCCTCACCGGGCGGCGGCCAACAATTGAACCCAGGCCAGACTTGGACCATAAATGTTAAT	180
GQ338247	GCCTCACCGGGCGGCGGCCAACAATTGGACCCAGGCCAGACTTGGACCATAAATGTTAAT	180
GQ338246	GCCTCACCGGGCGGCGGCCAACAATTGGACCCAGGCCAGACTTGGACCATAAATGTTAAT	180
	*****	

GQ338252	GCAGGCCAAACTGGAGGTCGTGTTTGGGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCCGGATCAAAT	240
GQ338253	GCAGGCCAAACTGGAGGTCGTGTTTGGGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCCGGATCAAAT	240
GQ338250	GCGGGCCAAACTGGAGGTCGTGTTTGGGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCCGGATCGAAT	240
GQ338249	GCGGGCCAAACTGGAGGTCGTGTTTGGGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCCGGATCAAAT	240
GQ338251	GCGGGCCAAACTGGAGGTCGTGTTTGGGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCCGGATCAAAT	240
GQ338248	GCGGGCCAAACTGGAGGTCGTGTTTGGGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCCGGATCAAAT	240
GQ338247	GCGGGCCAAACTGGAGGTCGTGTTTGGGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCCGGATCAAAT	240
GQ338246	GCGGGCCAAACCGAGGTTGTGTTTGGGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCCGGATCAAAT ** *****	240
GQ338252	GGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTGCGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCTCC	300
GQ338253	GGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTGCGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCTCC	300
GQ338250	GGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTGCGGTGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCTCC	300
GQ338249	GGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTGCGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCACC	300
GQ338251	GGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTGCGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCACC	300
GQ338248	GGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTGCGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCACC	300
GQ338247	GGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTGCGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCTCC	300
GQ338246	GGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTGCGGTGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTACGGCTCC *****	300
GQ338252	CCTCCTAACACTTTGGCTGAATATTCATTGAACCTGTACAACAACATGGACTTCTTTGAC	360
GQ338253	CCTCCTAACACTTTGGCTGAATATTCATTGAACCTGTACAACAACATGGACTTCTTTGAC	360
GQ338250	CCTCCTAACACTTTGGCTGAATATTCATTGAACAGTACAACAACATGGACTTCTTTGAC	360
GQ338249	CCTCCTAACACTTTGGCTGAATATTCATTGAACAGTACAACAACATGGACTTCTTTGAC	360
GQ338251	CCTCCTAACACTTTGGCTGAATATTCATTGAACAGTACAACAACATGGACTTCTTTGAC	360
GQ338248	CCTCCTAACACTTTGGCTGAATATTCATTGAACAGTACAACAACATGGACTTCTTTGAC	360
GQ338247	CCTCCTAACACTTTGGCTGAATATTCATTGAACAGTACAACAACATGGACTTCTTTGAC	360
GQ338246	CCTCCTAACACTTTGGCTGAATATTCATTGAACAGTACAATAACTGGACTTCTTTGAC *****	360
GQ338252	ATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCCCAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGTTGC	420
GQ338253	ATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCCCAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGTTGC	420
GQ338250	ATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCCCAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGTTGC	420
GQ338249	ATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCCCAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGCTGC	420
GQ338251	ATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCCCAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGCTGC	420
GQ338248	ATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCCCAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGCTGC	420
GQ338247	ATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCCCAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGCTGC	420
GQ338246	ATGTCACCTTGTGATGGGTTCAATGTCCCAATGTCCTTTCTCCCAACATCTAATGGCTGC *****	420
GQ338252	ACTAATGGTCCTACATGTACGGTAGACATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGTGCTAAAAGCC	480
GQ338253	ACTAATGGTCCTACATGTACGGTAGACATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGTGCTAAAAGCC	480
GQ338250	ACTAGTGGTCCTACATGTACGGCGGACATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGTACTAAAAGCC	480
GQ338249	ACCAATGGTCCTACATGTACGGCGGACATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGAGCTAAAAGCC	480
GQ338251	ACCAATGGTCCTACATGTACGGCGGACATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGAGCTAAAAGCC	480
GQ338248	ACCAATGGTCCTACATGTACGGCGGACATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGAGCTAAAAGCC	480
GQ338247	ACCAATGGTCCTACATGTACGGCGGACATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGAGCTAAAAGCC	480
GQ338246	ACCAATGGTCCTACATGTACGGCGAGACATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGAGCTAAAAGCC ** *	480
GQ338252	CCAGGTGGTTGCAACAATCCATGCATTGTTTTTAAGACCGATGAATATTGTTGTAATTCT	540
GQ338253	CCAGGTGGTTGCAACAATCCATGCATTGTTTTTAAGACCGATGAATATTGTTGTAATTCT	540
GQ338250	CCAGGTGGTTGCAACAATCCATGCATTGTTTTTAAGACCGATGAATACTGTTGTAATTCT	540
GQ338249	CCAGGTGGTTGCAACAATCCATGCATTGTTTTTAAGACCGATGAATACTGTTGTAATTCT	540
GQ338251	CCAGGTGGTTGCAACAATCCATGCATTGTTTTTAAGACCGATGAATACTGTTGTAATTCT	540
GQ338248	CCAGGTGGTTGCAACAATCCATGCATTGTTTTTAAGACCGATGAATACTGTTGTAATTCT	540
GQ338247	CCAGGTGGTTGCAACAATCCATGCATTGTTTTTAAGACCGATGAATACTGTTGTAATTCT	540
GQ338246	CCAGGTGGTTGCAACAATCCATGCATTGTTTTTAAGACCGATGAATACTGCTGTAATTTT *****	540
GQ338252	GGGAGCTGTGGTCCTACGAGCTACTCTGAATTTTTTAAGAACCTGTGTCCTAATGCTTAT	600
GQ338253	GGGAGCTGTGGTCCTACGAGCTACTCTGAATTTTTTAAGAACCTGTGTCCTAATGCTTAT	600
GQ338250	GGGAGCTGTAGTCCTACGAGCTACTCTGAATTTTTTAAGAACCTGTGTCCTGATGCTTAT	600
GQ338249	GGAAGCTGTGGTCCTACGAGCTACTCTGAATTTTTTAAGAACCTGTGTCCTAATGCTTAT	600
GQ338251	GGGAGCTGTGGTCCTACGAGCTACTCTGAATTTTTTAAGAACCTGTGTCCTAATGCTTAT	600
GQ338248	GGGAGCTGTGGTCCTACGAGCTACTCTGAATTTTTTAAGAACCTGTGTCCTAATGCTTAT	600
GQ338247	GGGAGCTGTAGTCCTACGAGCTACTCTGAATTTTTTAAGAACCTGTGTCCTGATGCTTAT	600
GQ338246	GGGAGCTGTGGTCCTACGAACCTACTCTGAGTTTTTTAAGAACCTTTTGCCCTGATGCTTAT ** *****	600

GQ338252	AATTACCCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTGCCCTGGTGGAAC TAATTATAAG	660
GQ338253	AATTACCCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTGCCCTGGTGGAAC TAATTATAAG	660
GQ338250	AGTTACCCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTGCCCGGTGGAAC TAATTATAAG	660
GQ338249	AGTTATCCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTGCGCTGGTGGAAC TAATTATAAG	660
GQ338251	AGTTATCCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTGCCCTGGTGGAAC TAATTATAAG	660
GQ338248	AGTTACCCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTGCCCTGGTGGAAC TAATTATAAG	660
GQ338247	AGTTACCCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTGCCCTGGTGGAAC TAATTATAAG	660
GQ338246	AGTTACTCCAAGGATGATGCAACAAGCACATATACCTGCCCTGGTGGAAC TAATTATAAG	660
	* * * * *	
GQ338252	GTTGTGTTTTGCCCTTAA	678
GQ338253	GTTGTGTTTTGCCCTTAA	678
GQ338250	GTTGTGTTTTGCCCTTAA	678
GQ338249	GTTGTGTTTTGCCCTTAA	678
GQ338251	GTTGTGTTTTGCCCTTAA	678
GQ338248	GTTGTGTTTTGCCCTTAA	678
GQ338247	GTTGTGTTTTGCCCTTAA	678
GQ338246	GTTGTGTTTTGCCCTTAA	678
	* * * * *	

**Abbildung 6.3 Alignment der TLP-Gen-Sequenzen verschiedener *Nepenthes*-Arten.**

Die Nukleotidsequenzen sind in Nepenthaceae stark konserviert und besitzen eine Ähnlichkeit von 96 bis 100%.

*N. singalana* (GQ338252), *N. ventricosa* (GQ338253), *N. mirabilis* (GQ338250), *N. rafflesiana* „Mizuho Kondo“ (GQ338249), *N. rafflesiana* (GQ338251), *N. henryana* (GQ338248), *N. gracilis* (GQ338247) und *N. ampullaria* (GQ338246). Eine 100%-ige Übereinstimmung ist durch \* gekennzeichnet.

**Abbildung 6.4 Alignment der TLP-Nukleotidsequenzen verschiedener Pflanzenarten.**

Die Nukleotidsequenzen sind konserviert innerhalb verschiedener Pflanzenarten und besitzen eine Ähnlichkeit von 66 bis 74%.

*N. gracilis* (GQ338247), *A. deliciosa* (AJ871175), *V. vinifera* (AF532965), *F. ananassa* (AF199508), *T. cacao* (AY766059), *P. trichocarpa* (XM\_002325041) und *H. annus* (AF364864). Eine 100%-ige Übereinstimmung ist durch \* gekennzeichnet.

AY766059	-----GCC-----	3
XM_002325041	ATGAGTCGTTTTCTTACTTATCGTTGTTTCCTGCTTCCTTCTTTTGCC-CATTTCTT	59
AF199508	ATGAGCCTTCTCAAAAACCTCCCTACTGTTTGTCCATCCTTTACTTTGCT-GCATCAAC	59
AJ871175	ATGAGCACCTTCAAATCTCTCT---CCCTTCCGCCCTCCTTTTCATTGCC-TTCCTCTT	56
AF364864	ATGACAACCTCCA-----CCCTTCCCACTTTCCTTCTCTTGGCTATTCTTTTT	48
AF532965	ATGGGCCTCTGCAAAATCCTCT---CCATTTCCTCATTCTCTCACC GCC-CTATTCTT	56
GQ338247	ATGAGCCAATTCATAAAATTC A---TTGTTTTCCCTAGTCTTCTACTTGCC-CTATTGTC	56
	* * *	
AY766059	-----AATGGTGCCACTATTAACATTCGAAACAACGTCCGTACACCGTCTGGGC	53
XM_002325041	CACCTTAAGCAACGCAGCTACTTTTCAAATCCGAAACCAATGCCCTTACACTGTTTGGGC	119
AF199508	CGTT-----AATGCAGCGACCTTCAATAAAAAAACAACGTGCCCTTCACTGTTTGGGC	113
AJ871175	CACTTGCTGCTCGTGAGCCACTTTTAATATCATAAACAACGTGCCCTTTCACCGTTTGGGC	116
AF364864	CACT-ATACCAATGCAGCCGTGTTCACTATTCGAAACAACGTCCATACACCGTTTGGGC	107
AF532965	CACCCCAAGCTATGCAGCCACCTTCAACATCCAAAACCAATGCTCCTACACGGTTTGGGC	116
GQ338247	GATATCCATCGATGCGGCCACATTTGACATCGTAAACAACGTGGCTATACGGTCTGGGC	116
	* * * * *	
AY766059	TGCAGCCGTGCCAGGTGGTGGTAGCGCGGTGGACAGAGGTGGAGTCTGGAACCT-AAACG	112
XM_002325041	CGCGGCTGTTCCTGGTGGGCCGAAGACTCGGCCAGGCCAATCATGGACCAT-CACCG	178
AF199508	CGGCGCAGTGCCAGGCGGTGGCAAACAACCTCGGCACCGGCCAAACATGGACGAT-AAATG	172
AJ871175	CGCTGCCGTTCAGGTGGTGCCAAACGCTTGACCGTGCCGAGAATTGGATCATCAATCC	176
AF364864	TGGTGCCTGCTGGTGGCGGCCGACAACCTTAACCTCAGGCCAAACCTGG-TCTTTAACCG	166
AF532965	TGCGGCAGTCCCAGGCGGGGCATGCAGCTTGGCTCAGGCCAATCCTGGAGCCT-CAATG	175
GQ338247	AGCTGCCTCACCGGGCGGTGGCCAACAATTGACCCAGGCCAGACTTGGACCAT-AAATG	175
	* * * * *	



AY766059	TGAACCTGGCACCACAGGAGCTCGTGTCTGGGCTCGAACCAAGTGCCAATTTCGATGGTG	172
XM_002325041	CGAGGGCCGGAACAACACAAGCCCGTATTGGGGACGGACCAACTGCATTTTCGATGGGG	238
AF199508	TGGCAGCCGGAACATAAGGAGCTCGCATTGGCCCCGAACAAATTGCACTTTGATGGAG	232
AJ871175	TGGT-GCAGGCACCAAAGCGCTAGAGTATGGCCCCGTACCGCTGCAATTTTGATGGGG	235
AF364864	TCGCAGCTGGCACAGCAGGAGCCCGTATATGGCCCCGAACCAATTGCACTTTGATGGTT	226
AF532965	TGAATGCCGGCACCACCTGGAGGCCGTGTTTGGGGCCGTACCAACTGCAACTTCGATGCGT	235
GQ338247	TTAATGCGGGCCAAACTGGAGGTCGTGTTTGGGCACGAACAGGGTGTAGCCTTTCCGGAT	235
	* * * * *	
AY766059	CCGGGCGTGGCAGA-TGCGAAACCGGTGACTGTGGGGGGCTCCTCCAGTGCCAAGCCTAT	231
XM_002325041	CCGGGCGAGGGATG-TGCGAGACAGGTGATTGCAATGGGCTCTTGCAATGCCAAGCCTTC	297
AF199508	CCGGACGTGGAAGA-TGCCAAACCGGTGACTGCGGCGGTCTCCTCCAGTGTCAAGGCTAT	291
AJ871175	CAGGGCGGGGCAAG-TGCCAAACCGGTGACTGCAACGGCTCCTCCAATGCCAAGCCTTT	294
AF364864	CTGGGCGAGGCAGG-TGTCAGACCGGTGATTGCAACGGTCTCCTCCAATGCCAAACTAT	285
AF532965	CAGGGAATGGGAAG-TGTGAGACCGGGGACTGTGGTGGCTCCTCCAATGCACGGCCTAT	294
GQ338247	C-AAATGGGGCAAGCTGCCAATCTGGCGACTGCGGCGGGTTGCTCCAGTGCCAAGGCTAC	294
	* * * * *	
AY766059	GGTGCACCCCCAACACCCTGGCTGAATACGCACTAAACCAGTTCAATAACAAGGATTTTC	291
XM_002325041	GGGCAACCCCCAACACACTGGCTGAATATGCCTTGAACCAATTCAACAACCTTGGATTTTC	357
AF199508	GGCCAGCCCCAACACCCTCGCCGAATATGCACCTAACCAATACATGAACAGGGATTTTC	351
AJ871175	GGTCAACCCCCAACACACTAGCTGAATATGCCCTAAACCAATTCAACAACCTTGGACTTC	354
AF364864	GGTACCCCAACCAACACATTGGCCGAGTACGCTTTGAACCAGTTCAACAATCTTGATTTTC	345
AF532965	GGTACACCCCTAACACCTTAGCCGAATTGCGCACTAACCAATTCAGCAACTTGGACTTC	354
GQ338247	GGTCCCCCTCTAACACTTTGGCTGAATATTCATTGAACCAGTACAACAACCTTGGACTTC	354
	* * * * *	
AY766059	TTCGATATCTCTTTAGTCGATGGATTTAATGTTCTATGGACTTTAGTCCAACCTTCTGGG	351
XM_002325041	TTTGACATATCTCTTGTGATGGGTTTAAATGTTCTATGGACTTCAGTCCAGTATCAGGC	417
AF199508	TATGATATCTCTCTGATTGATGGCTTCAATGTCCCGATGGACTTTAGTCCGTCTCTAAC	411
AJ871175	TTTGACATATCCCTCGTTGATGGGTTCAATGTGGCGATGGAATTTAGCCCTACGTCTGGT	414
AF364864	TTTGACATTTCTCTTGTGGACGGATTCAATGTGCCGATGGTGTGTTAGACCAATTTCTAAT	405
AF532965	TTTGATATATCTTTGGTTGATGGATTTAATGTGCCTATGGCCTTTAATCTACTTCCAAT	414
GQ338247	TTTGACATGTCACTTGTGATGGGTTCAATGTCCCAATGTCTTTCTCCCAACATCTAAT	414
	* * * * *	
AY766059	GGGTGCACCCGGGGTATTAGATGCACGGCAGATATCATAGGGCAGTGCCCTAATCAATTG	411
XM_002325041	AACTG---CCGCGGAATTAGGTGCGCAGCTGATATCAATGGACAGTGCCCAAAATCCGCTC	474
AF199508	GGCTGCACTAGGGGTATCAGATGCACCGCCGATATCAATGGACAGTGCCCGGCGCAGTTG	471
AJ871175	GGGTGCACCCGTGGCATCAAATGTACTGCAGATATAAACGGGCAGTGCCCAAAATGAGTTA	474
AF364864	GGGTGCACCCGGGGTATCTCATGTACTGCGGATATCAATGGCCAGTGTCTGGTGAGTTA	465
AF532965	GGGTGCACCCGTGGCATCAGTTGCACCGCCGACATCGTGGGAGAGTGCCCCGCTGCGCTA	474
GQ338247	GGCTGCACCAATGGTCTTACATGTACGGCGGACATAAATGGGCAGTGCCCAAGTGAGCTA	474
	* * * * *	
AY766059	AAAGCTCCGGGCGGGTGCAATAACCCTTGCACCGTTTTTCAGGACTGATCAATATTGTTGC	471
XM_002325041	AGGGCCAGCGGAGGGTGCAACAATCCTTGCACTGTCTTCAAGACAGATCAATACTGTTGC	534
AF199508	AGGGCTCCCGGTGGATGTAACAATGCGTGCACTGTGTCCAAAACCGATCAGTATTGCTGT	531
AJ871175	CGTGCCCTGGTGGGTGTAATAACCCATGTACCGTATTCAAGACCGATCAGTACTGTTGC	534
AF364864	CGGGCTCCTGGCGGGTGCAATAACCCTTGCACCGGTGTACAAAACCTGATCAGTATTGTTGC	525
AF532965	AAGACTACCGGTGGTTGCAACAACCCATGCACCGTTTTTCAAGACCGATGAATATTGTTGC	534
GQ338247	AAAGCCCAAGGTGGTTGCAACAATCCATGCATGCTTTTTTAAGACCGATGAATACTGTTGT	534
	* * * * *	
AY766059	AATTCTGGGAACTGTAGGCCTACGGATTTTTTCCAGGTTCTTCAAAACAAGGTGCCCCGAC	531
XM_002325041	AATTCTGGCAGCTGTGAACCAACAAATTACTCTAGGTTTTTCAAGCAGAGGTGCCCTGAC	594
AF199508	AATTCTGGTCACTGTGGTCTACAGACTACTCTAGGTTTTTCAAAAGTCGATGCCCGGAT	591
AJ871175	AACTCCGGAATTTGCGGGCTCACAAATTTCTCAAAGTTTTTCAAGGATAGATGCCAGAT	594
AF364864	AACTCTGGAATTTGTGGACCAACTGATTTATCAAGGTTTTTCAAGACAGATGTCCTGAT	585
AF532965	AATTCTGGGAGCTGTAATGCTACAGATTACTCAAGGTTTTTCAAGACTAGGTGCCCTGAT	594
GQ338247	AATTCTGGGAGCTGTAGTCTACGAGCTACTCTGAATTTTTTAAGAACCTGTGTCCTGAT	594
	* * * * *	
AY766059	GCTTACAGTTACCCTAAAGATGATCAAACAAGCAGG-----TTTACTTGCCCTGGTGGG	585
XM_002325041	GCTTATAGTTATCCTAAAGATGACCAAAGAAGCAGG-----TTCACCTGTCCCGGTGGA	648
AF199508	GCTTACAGTTACCCTAAAGATGATGCAACCAGCACCCTGCTTTTTTACTTGCCCTGGCGGT	651
AJ871175	GCTTATAGTTACCCTAAGGATGATCAAACCTAGCACA-----TTTACATGCCCTGCGGGA	648
AF364864	GCATATAGTTATCCCAAGGATGATCCAACCTAGCACA-----TTTACGTGCCCGGTGGA	639
AF532965	GCTTATAGCTACCCTAAGGACGATCAGACAAGCAGG-----TTCACATGCCCTGCCCGT	648
GQ338247	GCTTATAGTTACCCCAAGGATGATGCAACAAGCACA-----TATACCTGCCCTGGTGGG	648
	* * * * *	

AY766059	ACTAACTACAGGGTTGTGTTCTGCCCTTGA	615
XM_002325041	ACTAATTACAGGGTTGTATTCTGCCCTTGA	678
AF199508	ACTAACTATAGGGTTGTGTTCTGCCCTTGA	681
AJ871175	ACCAACTATAAGGTGGTGTGTTTGGCCCTTGA	678
AF364864	ACCAACTACGACGTTATATTCTGCCCTTGA	669
AF532965	ACCAATTATGAAGTTGTCTTCTGCCCATAA	678
GQ338247	ACTAATTATAAGGTGTGTTTGGCCCTTAA	678
	** * * * * * * * * * * *	

GQ338256	ATGAAGACCCATTATTTCATCAGCAATTCTCCCAATCCTCACCTCTTCGTCTTTCTCTCG	60
GQ338260	ATGAAGACCCATTATTTCATCAGCAATTCTCCCAATCCTCACCTCTTCGTCTTTCTCTCG	60
GQ338259	ATGAAGACCCATTATTTCATCAGCAATTCTCCCAATCCTCACCTCTTCGTCTTTCTCTCG	60
GQ338257	ATGAAGACCCATTATTTCATCAGCAATTCTCCCGATCCTCACCTCTTCGTCTTTCTCTCG	60
GQ338261	ATGAAGACCCATTATTTCATCAGCAATTCTCCCGATCCTCACCTCTTCGTCTTTCTCTCG	60
GQ338255	ATGAAGACCCATTATTTCATCAGCAATTCTCCCGATCCTCACCTCTTCGTCTTTCTCTCG	60
GQ338254	ATGAAGACCCATTATTTCATCAGCAATTCTCCCGACCTCACTCTCTTCGTCTTTCTCTCG	60
GQ338258	ATGAAGACCCATTATTTCATCAGCAATTCTCCCGACCTCACTCTCTTCGTCTTTCTCTCG	60
	***** * * * * * * * * * * *	
GQ338256	ATCAATCCATCCCATGGCTCCGGCATAGCAGTCTACTGGGGCCAAAACGGCAACGAAGGA	120
GQ338260	ATCAATCCATCCCATGGCTCCGGCATAGCAGTCTACTGGGGCCAAAACGGCAACGAAGGA	120
GQ338259	ATCAATCCATCCCATGGCTCCGGCATAGCAGTCTACTGGGGCCAAAACGGCAACGAAGGA	120
GQ338257	ATCAATCCATCCCATGGCTCCGGCATAGCAGTCTACTGGGGCCAAAACGGCAACGAAGGA	120
GQ338261	ATCAATCCATCCCATGGCTCCGGCATAGCAGTCTACTGGGGCCAAAACGGCAACGAAGGA	120
GQ338255	ATCAATCCATCCCATGGCTCCGGCATAGCAGTCTACTGGGGCCAAAACGGCAACGAAGGA	120
GQ338254	ATCAATCCATCCCACGGTCCGGCATAGCGGTCTACTGGGGCCAAAACGGCAACGAAGGA	120
GQ338258	ATCAATCCATCCCACGGTCCGGCATAGCGGTCTACTGGGGCCAAAACGGCAACGAAGGA	120
	***** * * * * * * * * * * *	
GQ338256	ACCTTATCCGACACCTGCGCCACCGGAACTACAACCTACGTGCTCGTATCTTTCCTAACT	180
GQ338260	ACCTTATCCGACACCTGCGCCACCGGAACTACAACCTACGTGCTCGTATCTTTCCTAACT	180
GQ338259	ACCTTATCCGACACCTGCGCCACCGGAACTATGAATACGTGCTCATATCTTTCCTAACT	180
GQ338257	ACCTTATCCGACACCTGCGCCACCGGAACTACAACCTACGTGCTCGTATCTTTCCTAACT	180
GQ338261	ACCTTATCCGACACCTGCGCCACCGGAACTACAACCTACGTGCTCGTATCTTTCCTAACT	180
GQ338255	ACCTTATCCGACACCTGCGCCACCGGAACTACAACCTACGTGCTCGTATCTTTCCTAACT	180
GQ338254	ACCTTATCCGACACCTGCGCCACCGGAACTACCAATACGTGCTCCTATCTTTCCTAACT	180
GQ338258	ACCTTATCCGACACCTGCGCCACCGGAACTACCAATACGTGCTCCTATCTTTCCTAACT	180
	***** * * * * * * * * * * *	
GQ338256	ACATTTGGCAACGGCCAGACGCCGGTGCTAAACCTAGCCGGCCACTGCGACCCAGCTCC	240
GQ338260	ACATTTGGCAACGGCCAGACGCCGGTGCTAAACCTAGCCGGCCACTGCGACCCAGCTCC	240
GQ338259	ACATTTGGCAACGGCCAGACGCCGGTGCTAAACCTAGCCGGCCACTGCGACCCAGCTCC	240
GQ338257	ACATTTGGCAACGGCCAGACGCCGGTGCTAAACCTTGCCGGCCACTGCGACCCAGCTCC	240
GQ338261	ACATTTGGCAACGGCCAGACGCCGGTGCTAAACCTTGCCGGCCACTGCGACCCAGCTCC	240
GQ338255	ACATTTGGCAACGGCCAGACGCCGGTGCTAAACCTTGCCGGCCACTGCGACCCAGCTCC	240
GQ338254	ACATTTGGCAACGGCCAGACGCCGGTGCTAAACCTAGCCGGCCACTGCGACCCAGCTCC	240
GQ338258	ACATTTGGCAACGGCCAGACGCCGGTGCTAAACCTAGCCGGCCACTGCGACCCAGCTCC	240
	***** * * * * * * * * * * *	
GQ338256	AACGGCTGCACTGGCCTAAGCACGGACATAACCTCATGCAAAAACCAAGGGATCAAGGTC	300
GQ338260	AACGGCTGCACTGGCCTAAGCACGGACATAACCTCATGCAAAAACCAAGGGATCAAGGTC	300
GQ338259	AACGGCTGCACTGGCCTAAGCACGGACATAACCTCATGCAAAAACCAAGGGATCAAGGTC	300
GQ338257	AACGGCTGCACTGGCCTAAGCACGGACATAACCTCATGCAAAAACCAAGGGATCAAGGTC	300
GQ338261	AACGGCTGCACTGGCCTAAGCACGGACATAACCTCATGCAAAAACCAAGGGATCAAGGTC	300
GQ338255	AACGGCTGCACTGGCCTAAGCACGGACATAACCTCATGCAAAAACCAAGGGATCAAGGTC	300
GQ338254	AACGGCTGCACTGGCCTAAGCACGGACATAACCTCATGCAAAAACCAAGGGATCAAGGTC	300
GQ338258	AACGGCTGCACTGGCCTAAGCACGGACATAACCTCATGCAAAAACCAAGGGATCAAGGTC	300
	***** * * * * * * * * * * *	
GQ338256	CTCCTATCACTTGGCGGTGCCTCCGGCAGCTACACTCTCGTCTCCACCGACGATGCTAAC	360
GQ338260	CTCCTATCACTTGGCGGTGCCTCCGGCAGCTACACTCTCGTCTCCACCGACGATGCTAAC	360
GQ338259	CTCCTATCCCTTGGCGGTGCCTCTGGCAGCTACAGTCTCGTCTCTACCGACGATGCTAGC	360
GQ338257	CTCCTATCCCTTGGCGGTGCCTCTGGCAGCTACAGTCTCGTCTCTACCGACGATGCTGAC	360
GQ338261	CTCCTATCCCTTGGCGGTGCCTCTGGCAGCTACAGTCTCGTCTCTACCGACGATGCTGAC	360
GQ338255	CTCCTATCCCTTGGCGGTGCCTCTGGCAGCTACAGTCTCGTCTCTACCGACGATGCTGAC	360
GQ338254	CTCCTATCCCTTGGCGGTGCCTCTGGCAGCTACTCTCTCGTCTCTACAGACGATGCTAAC	360
GQ338258	CTCCTATCCCTTGGCGGTGCCTCTGGCAGCTACTCTCTCGTCTCTACAGACGATGCTAAC	360
	***** * * * * * * * * * * *	

GQ338256	CAGGTCGCCGCTTACCTTTGGAATAACTACCTCGGCGGTGAGTCAGATTCCCGCCCACTT	420
GQ338260	CAGGTCGCCGCTTACCTTTGGAATAACTACCTCGGCGGTGAGTCAGATTCCCGCCCACTT	420
GQ338259	CAGGTCGCCCACTTACCTTTGGAATAACTACCTCGGCGGTGAGTCAGATTCCCGCCCACTT	420
GQ338257	CAGGTCGCCGCTTACCTTTGGAATAACTACCTCGGCGGTGAGTCAGATTCCCGCCCACTT	420
GQ338261	CAGGTCGCCGCTTACCTTTGGAATAACTACCTCGGCGGTGAGTCAGATTCCCGCCCACTT	420
GQ338255	CAGGTCGCCGCTTACCTTTGGAATAACTACCTCGGCGGTGAGTCAGATTCCCGCCCACTT	420
GQ338254	CAGGTCGCTGCTTACCTTTGGAATAACTACCTCGGCGGTGAGTCAGATTCCCGCCCACTT	420
GQ338258	CAGGTCGCTGCTTACCTTTGGAATAACTACCTCGGCGGTGAGTCAGATTCCCGCCCACTT *****	420
GQ338256	GGATCGGCTGTTCTCGATGGCATCGACTTTGACATCGAGGCTGGCTCGGACGATTACTGG	480
GQ338260	GGATCGGCTGTTCTCGATGGCATCGACTTTGACATCGAGGCTGGCTCGGACGATTACTGG	480
GQ338259	GGATCAGCTGTTCTCGATGGCATCGACTTTGACATCGAGGCTGGCTCGGACGATTACTGG	480
GQ338257	GGATCAGCTGTTCTCGATGGCATCGACTTTGACATCGAGAGTGGCTCGGACAATTACTGG	480
GQ338261	GGATCAGCTGTTCTCGATGGCATCGACTTTGACATCGAGAGTGGCTCGGACAATTACTGG	480
GQ338255	GGATCAGCTGTTCTCGATGGGATCGACTTTGACATCGAGAGTGGCTCGGACAATTACTGG	480
GQ338254	GGATCGGCTGTTCTCGATGGCATCGACTTTGACATCGAGAGTGGCACGGATGATTACTGG	480
GQ338258	GGATCGGCTGTTCTCGATGGCATCGACTTTGACATCGAGAGTGGCGCGGATGATTACTGG *****	480
GQ338256	GGCGACTTAGCAAGCGCTCTCAAAGGGTATAGCCAGAGCGTTCTCGTGTGGCAGCTCCG	540
GQ338260	GGCGACTTAGCAAGCGCTCTCAAAGGGTATAGCCAGAGCGTTCTCGTGTGGCAGCTCCG	540
GQ338259	GGCGACTTAGCAAGCGCTCTCAAAGGGTATAGCCAGAGCGTTCTCGTGTGGCAGCTCCG	540
GQ338257	GGAGACTTAGCGACCGCTCTGAAAACTATAGTCAGAGCGTGCTCGTGTGGCAGCTCCG	540
GQ338261	GGAGACTTAGCGACCGCTCTGAAAACTATAGTCAGAGCGTGCTCGTGTGGCAGCTCCG	540
GQ338255	GGCGACTTAGCGAGCGCTCTGAAAACTATAGTCAGAGCGTGCTCGTGTGGCAGCTCCG	540
GQ338254	GGCGACTTAGCGAGCGCTCTGAAAACTATAGTCAGAGCGTGCTCGTGTGGCAGCTCCG	540
GQ338258	GGCGACTTAGCGAGCGCTCTGAAAACTATAGTCAGAGCGTGCTCGTGTGGCAGCTCCG ** ***** *	540
GQ338256	CAGTGCCCGTACCCGGACGCCCATTTAGACACGGCCATCGCGACCGGGATATTCGACTAC	600
GQ338260	CAGTGCCCGTACCCGGACGCCCATTTAGACACGGCCATCGCGACCGGGATATTCGACTAC	600
GQ338259	CAGTGCCCGTACCCGGACGCCCATTTAGACACGGCCATCGCGACCGGGATATTCGACTAC	600
GQ338257	CAGTGCCCATACCCGGATGCCCATTTAGACTTGCCATCGCAACCGGGATATTCGACTAC	600
GQ338261	CAGTGCCCATACCCGGATGCCCATTTAGACTTGCCATCGCAACCGGGATATTCGACTAC	600
GQ338255	CAGTGCCCATACCCGGATGCCCATTTAGACTTGCCATCGCAACCGGGATATTCGACTAC	600
GQ338254	CAGTGCCCGTACCCGGACGCCCATTTAGACAAGGCCATCGCGACCGGGATATTCGACTAC	600
GQ338258	CAGTGCCCGTACCCGGACGCCCATTTAGACAAGGCCATCGCGACCGGGATATTCGACTAC *****	600
GQ338256	GTGTGGGTGCAGTTTTTACAACAACGAACAGTGCGAGTACGTCAACGACGATACTAACCTC	660
GQ338260	GTGTGGGTGCAGTTTTTACAACAACGAACAGTGCGAGTACGTCAACGACGATACTAACCTC	660
GQ338259	GTGTGGGTGCAGTTTTTACAACAACGAACAGTGCGAGTACGTCAACGACGATACTAACCTC	660
GQ338257	GTGTGGGTGCAGTTTTTACAACAACGAACAGTGCGAGTATGTCACCGACGATACTAACCTC	660
GQ338261	GTGTGGGTGCAGTTTTTACAACAACGAACAGTGCGAGTATGTCACCGACGATGCTAACCTC	660
GQ338255	GTGTGGGTGCAGTTTTTACAACAACGAACAGTGCGAGTACGTCAACGACGATACTAACCTC	660
GQ338254	GTGTGGGTGCAGTTTTTACAACAACGAACAGTGCGAGTACGTCAACGACGATACTAACCTC	660
GQ338258	GTGTGGGTGCAGTTTTTACAACAACGAACAGTGCGAGTACGTCAACGACGATACTAACCTC *****	660
GQ338256	TTGAGTGCATGGAACCAATGGACATCTTCCCAAGCCAACGTAGTTTTTCTCGGACTACCT	720
GQ338260	TTGAGTGCATGGAACCAATGGACATCTTCCCAAGCCAACGTAGTTTTTCTCGGACTACCT	720
GQ338259	TTGAGTGCATGGAACCAATGGACATCTTCCCAAGCCAACGTAGTTTTTCTCGGACTACCT	720
GQ338257	TTGAGTGCATGGAACCAATGGACATCTTCCCAAGCCAACGTAGTTTTTCTCGGACTACCT	720
GQ338261	TTGAGTGCATGGAACCAATGGACATCTTCCCAAGCCAACGTAGTTTTTCTCGGACTACCT	720
GQ338255	TTGAGTGCATGGAACCAATGGACATCTTCCCAAGCCAACGTAGTTTTTCTCGGACTACCT	720
GQ338254	TTGAGTGCATGGAACCAATGGACATCTTCTCAAGCCAACGTAGTTTTTCTCGGACTACCT	720
GQ338258	TTGAGTGCATGGAACCAATGGACATCTTCTCAAGCCAACGTAGTTTTTCTCGGACTACCT *****	720
GQ338256	GCATCTACGGATGCAGCAAGCAGCGGTTACATTTCCACCGGACGTGCTTATATCTCAAGTT	780
GQ338260	GCATCTACGGATGCAGCAAGCAGCGGTTACATTTCCACCGGACGTGCTTATATCTCAAGTT	780
GQ338259	GCATCTACGGATGCAGCAAGCAGCGGTTACATTTCCACCGGACGTGCTTATATCTCAAGTT	780
GQ338257	GCATCTACGGATGCAGCAAGCAGCGGTTACATTTCCACCGGACGTGCTTATATCTCAAGTT	780
GQ338261	GCATCTACGGATGCAGCAAGCAGCGGTTACATTTCCACCGGACGTGCTTATATCTCAAGTT	780
GQ338255	GCATCTACGGATGCAGCAAGTAGCGGTTACATTTCCACCGGACGTGCTTATATCACAAGTT	780
GQ338254	GCATCTACGGCTGCAGCGAACAGCGGTTACATTTCCACCGGACGTGCTTATATCACAAGTT	780
GQ338258	GCATCTACGGCTGCAGCGAACAGCGGTTACATTTCCACCGGACGTGCTTATATCACAAGTT *****	780

Die *NrChit1*-Sequenzen sind in Nepenthaceae stark konserviert und weisen eine Ähnlichkeit von 95 bis 100% auf. *N. singalana* (GQ338256), *N. gracilis* (GQ338260), *N. rafflesiana* "Mizuho Kondo" (GQ338259), *N. rafflesiana* (GQ338257), *N. ampullaria* (GQ338261), *N. thorelii* (GQ338255), *N. ventricosa* (GQ338254) und *N. mirabilis* (GQ338258). Eine 100%-ige Übereinstimmung ist durch \* gekennzeichnet.

- 107



Z68123	TTCATGGAACCGGTGGACTTCATCGATAAATTCACGGGATCCTTCATGGGCTGCCGGC	743
Y16415	TTCATGGAACCAATGGACTTCATC-ACAAGCTAAACAAGTGTTTT--TGGGTCTCCCAGC	716
S66038	CTCGTGGAAACAGTGGACCACAGT-ACAAGCTAACCAGA--TCTTCCTCGGACTACCAGC	725
FJ589785	CAGTTGGAGCCAATGGGGCTCGGT-TCCGGCCACCCAGG--TATTCATGGGGTTACCGGC	734
M24365	TTCATGGAATCAGTGGACGGCGTT-TCCGAC--ATCGAAGCTTTACATGGGATTGCCAGC	716
GQ338257	TGCATGGAACCAATGGACATCGTC-TCAGGCCAACGTAG--TTTTCTCGGACTACCTGC	722
AB003195	CGCGTGAAGCAGTGGACGTCGAT-CCCGCGGGGACGGG--TGTTCTCGGCTGCCGGT	752
	**** * *** *	
Z68123	ATCCTCTGCAGCTGCCGGAAGGGGG---TTTATTCCGGCCAATGTGTTGACCTCTCAAAT	800
Y16415	ATCTGAAGCAGCTGCTCCAAGTGGTGGTTTTATTCTACTGATGTGCTCATTTCTCAAGT	776
S66038	ATCAACTGATGCTGCCGGCAGTGGT---TTTATTCCAGCAGATGCTCTTACATCTCAAGT	782
FJ589785	GTCCACTGATGCCGCGGGCAGCGGA---TTTATTCTGCTGATGCTCTCAAGTCACAAGT	791
M24365	GGCACGGGAGGCAGCGCCGAGCGGGGGATTATTCCGGCGGATGTGCTTATTTCTCAAGT	776
GQ338257	ATCTACGGATGCAGCAAGCAGCGGT---TACATTTACCGGACGTGCTTATATCTCAAGT	779
AB003195	CGCCGCGGAGGCCGCGGCTCCGGG---TTCGTGGAGACGAGCGACCTGGTGTGCAAGGT	809
	* * ** ** ** * * * * *	
Z68123	TCTTCCGGTCATTAAGAGATCACCCAAGTATGGAGGCGTGATGCTGTGGTCAAAGTACTA	860
Y16415	TCTTCTACTATCAAGACTTCTCCTAAGTATGGTGGAGTCATGCTTTGGACGGATTCAA	836
S66038	CCTTCCCACTATCAAGGGTTCTGCTAAATATGGAGGAGTCATGCTATGGTCAAAGGCATA	842
FJ589785	CCTTCCAACAATTAAGAATTCGGCGAAGTATGGAGGAGTTATGCTTTGGAGCAGGTGGTA	851
M24365	TCTTCCAACCATTAAGCTTCTTCCAACATATGGAGGAGTGATGTTATGGAGTAAGGCGTT	836
GQ338257	TCTTCCCTCTATTAAGGCTTCATCAAAGTATGGTGGTGTATGTTATGGTCGAAATACTA	839
AB003195	GCTCCCCGTGGTGAAGAAGTCTCCAAGTACGGAGGGATCATGCTGTGGTCGCGGTACTA	869
	** ** * ** ** * * * * * * * * *	
Z68123	TGATGATCAGAGTGGATACAGCTCTTCCATTAAGAGCAGTGTG---TGA	906
Y16415	TGACATTCAAACCTGGATATAGTGATGCCATTAAGGCCAGCGTT---TAA	882
S66038	TGAC-----AGTGGGTACAGCAGTGCTATTAAAAGCAGTGTT---TAA	882
FJ589785	TGACATTAACAGCGGTTATAGTGCATCCATTAAGGACAGCATC---TAA	897
M24365	TGAC-----AATGGCTACAGCGATTCCATTAAGGCAGCATCGGCTGA	879
GQ338257	CGAT-----AACGGGTATAGCTCAGCTATCAAGGATAGTGTT---TAA	879
AB003195	TGACGGGCTCACGGGGTACAGCGACAAGGTGAAGTCCAGCGTT---TGA	915
	** * ** ** ** * ** ** * *	

**Abbildung 6.6 Alignment der mRNA-Endochitinase-Sequenzen verschiedener Pflanzenarten.**

Die Endochitinase-Sequenzen sind innerhalb verschiedener Pflanzenarten konserviert und besitzen eine Ähnlichkeit von 55 bis 68%.

*V. vinifera* (Z68123), *L. albus* (Y16415), *B. vulgaris* (S66038), *P. pyrifolia* (FJ589785), *C. sativus* (M24365), *N. rafflesiana* (GQ338257) und *O. sativa* (AB003195). Eine 100%-ige Übereinstimmung ist durch \* gekennzeichnet.

Tabelle 6.2a. Ähnlichkeiten (oben) und Unterschiede (unten) der TLP-Nukleotidsequenzen verschiedener *Nepenthes*- (links) bzw. Pflanzenarten (rechts).

	<i>N. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>N. h.</i>	<i>N. r. MZ</i>	<i>N. m.</i>	<i>N. r.</i>	<i>N. s.</i>	<i>N. v.</i>	
<i>N. a.</i>		97,6	96,6	96,3	96,2	96,8	95,9	95,9	<i>N. a.</i>
<i>N. g.</i>	4,2		98,7	98,4	98,2	98,8	97,6	97,6	<i>N. g.</i>
<i>N. h.</i>	5,3	3,1		98,5	96,9	98,7	96,9	96,9	<i>N. h.</i>
<i>N. r. MZ</i>	8,3	6,1	5,1		96,6	99,3	96,6	96,6	<i>N. r. MZ</i>
<i>N. m.</i>	4,0	8,1	2,3	5,3		97,1	96,8	96,8	<i>N. m.</i>
<i>N. r.</i>	3,3	2,1	3,1	0,7	3,0		97,1	97,1	<i>N. r.</i>
<i>N. s.</i>	3,4	4,2	2,3	5,3	3,3	3,0		100,0	<i>N. s.</i>
<i>N. v.</i>	3,4	4,2	2,3	5,3	3,3	3,0	0,0		<i>N. v.</i>
	<i>N. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>N. h.</i>	<i>N. r. MZ</i>	<i>N. m.</i>	<i>N. r.</i>	<i>N. s.</i>	<i>N. v.</i>	

*N. ampullaria* (*N. a.*), *N. gracilis* (*N. g.*), *N. henryana* (*N. h.*), *N. rafflesiana* "Mizuho Kondo" (*N. r. MZ*), *N. mirabilis* (*N. m.*), *N. rafflesiana* (*N. r.*), *N. singalana* (*N. s.*) und *N. ventricosa* (*N. v.*).

	<i>A. d.</i>	<i>F. a.</i>	<i>H. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>P. t.</i>	<i>T. c.</i>	<i>V. v.</i>	
<i>A. d.</i>		71,6	74,0	68,8	71,1	74,6	72,2	<i>A. d.</i>
<i>F. a.</i>	36,3		70,5	67,7	70,1	74,6	71,5	<i>F. a.</i>
<i>H. a.</i>	32,7	38,0		66,3	69,8	74,4	70,4	<i>H. a.</i>
<i>N. g.</i>	40,9	42,9	45,8		66,5	69,1	69,1	<i>N. g.</i>
<i>P. t.</i>	37,0	38,6	39,2	45,0		73,5	71,4	<i>P. t.</i>
<i>T. c.</i>	31,4	33,1	38,1	40,8	33,2		74,8	<i>T. c.</i>
<i>V. v.</i>	35,3	36,2	38,2	40,3	36,3	31,2		<i>V. v.</i>
	<i>A. d.</i>	<i>F. a.</i>	<i>H. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>P. t.</i>	<i>T. c.</i>	<i>V. v.</i>	

*A. deliciosa* (*A. d.*), *F. ananassa* (*F. a.*), *H. annuus* (*H. a.*), *N. gracilis* (*N. g.*), *P. trichocarpa* (*P. t.*), *T. cacao* (*T. c.*) und *V. vinifera* (*V. v.*).

Tabelle 6.2b. Ähnlichkeiten (oben) und Unterschiede (unten) der Endochitinase-Nukleotidsequenzen verschiedener *Nepenthes*- (links) bzw. Pflanzenarten (rechts).

	<i>N. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>N. r. MZ</i>	<i>N. m.</i>	<i>N. r.</i>	<i>N. s.</i>	<i>N. t.</i>	<i>N. v.</i>	
<i>N. a.</i>		96,1	95,8	94,5	99,9	96,1	98,7	94,5	<i>N. a.</i>
<i>N. g.</i>	4,0		98,3	95,7	96,2	100,0	96,2	95,7	<i>N. g.</i>
<i>N. r. MZ</i>	3,4	7,1		95,3	95,9	98,3	95,9	95,3	<i>N. r. MZ</i>
<i>N. m.</i>	7,5	5,4	8,4		94,7	95,7	94,8	99,9	<i>N. m.</i>
<i>N. r.</i>	0,1	9,3	2,4	6,5		96,2	98,9	94,7	<i>N. r.</i>
<i>N. s.</i>	4,0	0,0	7,1	5,4	9,3		96,2	95,7	<i>N. s.</i>
<i>N. t.</i>	3,1	9,3	2,4	4,5	1,1	9,3		94,8	<i>N. t.</i>
<i>N. v.</i>	7,5	5,4	8,4	0,1	6,5	5,4	4,5		<i>N. v.</i>
	<i>N. a.</i>	<i>N. g.</i>	<i>N. r. MZ</i>	<i>N. m.</i>	<i>N. r.</i>	<i>N. s.</i>	<i>N. t.</i>	<i>N. v.</i>	

*N. ampullaria* (*N. a.*), *N. gracilis* (*N. g.*), *N. rafflesiana* "Mizuho Kondo" (*N. r. MZ*), *N. mirabilis* (*N. m.*), *N. rafflesiana* (*N. r.*), *N. singalana* (*N. s.*), *N. thorelii* (*N. t.*) und *N. ventricosa* (*N. v.*).

	<i>B. v.</i>	<i>C. s.</i>	<i>L. a.</i>	<i>N. r.</i>	<i>O. s.</i>	<i>P. p.</i>	<i>V. v.</i>	
<i>B. v.</i>		63,7	67,7	66,1	58,3	67,0	63,6	<i>B. v.</i>
<i>C. s.</i>	50,6		65,2	63,8	59,6	65,9	63,4	<i>C. s.</i>
<i>L. a.</i>	43,2	47,4		63,1	55,2	69,3	65,2	<i>L. a.</i>
<i>N. r.</i>	46,0	50,0	51,5		63,2	63,4	61,9	<i>N. r.</i>
<i>O. s.</i>	62,3	58,4	70,9	50,7		59,5	60,7	<i>O. s.</i>
<i>P. p.</i>	44,4	46,0	40,0	50,7	59,0		62,8	<i>P. p.</i>
<i>V. v.</i>	50,4	51,0	47,3	53,5	56,4	52,4		<i>V. v.</i>
	<i>B. v.</i>	<i>C. s.</i>	<i>L. a.</i>	<i>N. r.</i>	<i>O. s.</i>	<i>P. p.</i>	<i>V. v.</i>	

*B. vulgaris* (*B. v.*), *C. sativus* (*C. s.*), *L. albus* (*L. a.*), *N. rafflesiana* (*N. r.*), *O. sativa* (*O. s.*), *P. pyrifolia* (*P. p.*) und *V. vinifera* (*V. v.*).

**NmAct**

ACCGAAGCCCCTCTTAACCCCAAAGCAAACAGGGAAAAGATGACTCAAATCATGTTTGAGACCTTCAAT  
 GTCCCTGCTATGTATGTTGCCATCCAGGCTGTTCTCTCACTCTATGCAAGTGGACGTACAACCTGGTATTG  
 TGCTCGACTCTGGTGATGGTGTGAGCCATAC

**NmACT1-1**

GAGGTCCTCTTCCAGCCTTCCCTAATTGGAATGGAAGCTGCAGGAATTCATGAGACTACTTACAATTCC  
 ATAATGAAGTGCGACGTTGATATCAGAAAGGATCTATACGGCAATATTGTTCTTAGCGGTGGATCAACCT  
ATGTTCCCTGGCATTGCTG

**Nm18SrRNA**

CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAGACATAGTAAGGATTGACAGACTG  
 AGAGCTCTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGGT  
 TAATTCCGTTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAC

**Nm26SrRNA**

CCCCTCCTTTTGGCTCTAAGGCGGCCCTCGTGGTACGCCAATCCGGGTGGAAGACATTGTTAGGTGGG  
 GAGTTTGGCTGGGGCGGCACATCTGTAAACGATAACGCAGGTGTCCTAAGATAAGCTCAACGAGAAC  
 AGAAATCTCGTGTGGAACAAAAGGGT

**Abbildung 6.7 Sequenzen der in der Real-time PCR verwendeten Referenzgene aus *N. mirabilis*.**

Die Identitäten der Sequenzfragmente wurden über eine Analyse in der NCBI-Datenbank bestätigt. Dabei ergaben sich folgende Ähnlichkeiten zu bekannten Pflanzensequenzen: 92% von *NmAct* (170 bp) zu *Castanea sativa* (GQ339776), 90% von *NmACT1-1* (157 bp) zu *Prunus persica* (AB046952), 100% von *Nm18SrRNA* (173 bp) zu *Rhamnus utilis* (JF317374) und 91% von *Nm26SrRNA* (162 bp) zu *Zea mays* (NR\_028022). Die unterstrichenen Bereiche markieren die Bindestellen der Primer, welche für die Identifizierung der Sequenzen verwendet wurden.



**Tabelle 6.3 Zusammenfassung der *Real-time* PCR-Ergebnisse.**

Ein signifikanter Unterschied besteht bei  $P(H1) < 0,001$ . g: geschlossene Kanne, o: offene Kanne, D. m.: *D. melanogaster*.

Material	Kontrollgruppe	Probengruppe	Expressionsverhältnis	P(H1)
<b><i>Thaumatin-like protein (NgTLP)</i></b>				
<i>N. alata</i> (g)	Drüsen	Gewebe	0,56	0,00
<i>N. mirabilis</i> (g)	Drüsen	Gewebe	0,63	0,00
<i>N. mirabilis</i> (o + D. m.)	Drüsen	Gewebe	3,13	0,00
Kannen (g)	<i>N. mirabilis</i>	<i>N. alata</i>	1,73	0,16
Drüsen (g)	<i>N. mirabilis</i>	<i>N. alata</i>	1,46	0,00
Gewebe (g)	<i>N. mirabilis</i>	<i>N. alata</i>	6,82	0,00
<i>N. mirabilis</i> (Kanne)	offen	offen + D. m.	2,13	0,10
<i>N. mirabilis</i> (Drüsen)	offen	offen + D. m.	1,92	0,16
<i>N. mirabilis</i> (Gewebe)	offen	offen + D. m.	7,43	0,00
<b><i>Endochitinase (NrChit1)</i></b>				
<i>N. alata</i> (g)	Drüsen	Gewebe	2,88	0,00
<i>N. mirabilis</i> (g)	Drüsen	Gewebe	1,87	0,00
<i>N. mirabilis</i> (o + D. m.)	Drüsen	Gewebe	10,04	0,00
Kannen (g)	<i>N. mirabilis</i>	<i>N. alata</i>	1,42	0,00
Drüsen (g)	<i>N. mirabilis</i>	<i>N. alata</i>	4,51	0,33
Gewebe (g)	<i>N. mirabilis</i>	<i>N. alata</i>	5,89	0,00
<i>N. mirabilis</i> (Kanne)	offen	offen + D. m.	1,66	0,00
<i>N. mirabilis</i> (Drüsen)	offen	offen + D. m.	1,76	0,16
<i>N. mirabilis</i> (Gewebe)	offen	offen + D. m.	7,52	0,00

---

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name	Sandy Rottloff
Geburtsdatum	28.06.1978
Geburtsort	Annaberg-Buchholz
Nationalität	Deutsch
Adresse	Friedrich-Engels-Straße 79, 07749 Jena
Email	Sandy.Rottloff@gmail.com
Telefon	0176 52420815

---

### Beruflicher Werdegang

Seit 03/2006	<b>Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Promotionsstudentin, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena</b>  Betreuer: PD Dr. Axel Mithöfer  Abteilung: Bioorganische Chemie  Thema: „Analyse der Proteinkomposition der Verdauungsflüssigkeit aus Kannen von <i>Nepenthes</i> sp.“
12/2004-02/2006	<b>Diplomarbeit, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena</b>  Betreuer: PD Dr. Axel Mithöfer  Abteilung: Bioorganische Chemie  Thema: „Proteinanalyse des Verdauungssekrets von <i>Nepenthes</i> sp.“
10/2000-02/2006	<b>Biochemie-Studium, Friedrich-Schiller-Universität, Jena</b>  Abschluss: Diplom <b>Hauptfächer:</b> Biochemie, Molekular-, Zell- und Mikrobiologie
08/1997-09/2000	<b>Ausbildung zur Medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin MTLA), IFBE Bildungszentrum, Zwickau</b>
Bis 07/1997	<b>St.-Annen-Gymnasium Annaberg-Buchholz, Außenstelle Schlettau</b>  Abschluss: Allgemeine Hochschulreife <b>Hauptfächer:</b> Mathematik und Chemie

---

## Veröffentlichungen

### Publikationen

**S. Rottloff**, R. Stieber, H. Maischak, F. Turini, G. Heubl und A. Mithöfer, Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. Journal of Experimental Botany, 2011, doi:10.1093/jxb/err173.

**S. Rottloff**, U. Müller, R. Kilper und A. Mithöfer, Micropreparation of single secretory glands from the carnivorous plant *Nepenthes*. Analytical Biochemistry, 2009, 394(1): 135-7.

### Vorträge

**S. Rottloff** und A. Mithöfer, PR proteins and carnivory - a new context for old proteins. Botanikertagung 2009, Leipzig.

**S. Rottloff** und A. Mithöfer, Plant - herbivore interactions: the other way round. Institutssymposium 2009, MPI für Chemische Ökologie, Jena.

**S. Rottloff** und A. Mithöfer, Molecular characterization of an acidic endochitinase from *Nepenthes rafflesiana*. 6. Mitteldeutsches Pflanzenphysiologen-Treffen & "Symposium on plant signal transduction" 2008, Jena.

### Poster

**S. Rottloff**, U. Müller und A. Mithöfer, Mikropräparation einzelner sekretorischer Drüsen aus Kannen der karnivoren Pflanze *Nepenthes*. 22. Pflanzenmolekularbiologie-Tagung 2009, Dabringhausen.

**S. Rottloff**, R. Stieber, M. Piotrowski und A. Mithöfer, Molekulare Charakterisierung einer sauren Endochitinase aus *Nepenthes rafflesiana*. 21. Pflanzenmolekularbiologie-Tagung 2008, Dabringhausen.

**S. Rottloff**, R. Stieber, M. Piotrowski und A. Mithöfer, Molecular characterization of an acidic endochitinase of *Nepenthes rafflesiana*. Botanikertagung 2007, Hamburg.

**S. Rottloff**, R. Stieber, H. Maischak und A. Mithöfer, Analysis of the digestive fluid from *Nepenthes*. Institutssymposium 2006, MPI für Chemische Ökologie, Jena.

---

## Lehre

Praktikumsbetreuung von Schülern und Studenten als Hilfwissenschaftler im Institut für Pflanzenphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, sowie im Rahmen der Doktorarbeit.

Unterweisung einer studentischen Hilfskraft und Betreuung eines Diplomanden.

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt PD Dr. Axel Mithöfer für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, für die fachliche Betreuung meiner Dissertation und die konstruktiven Diskussionen und Anregungen. Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Wilhelm Boland für die Finanzierung meiner Dissertation und die Möglichkeit diese in seinem Labor anfertigen zu können bedanken.

Auch danke ich den Mitarbeitern der Botanischen Gärten in Jena und München sowie dem Gewächshausteam des MPIs für Chemische Ökologie für die Betreuung und Bereitstellung des Pflanzenmaterials. Besonderer Dank gilt hierbei Herrn Fehringer vom Botanischen Garten in Jena, für die bereitwillige Opferung der Kannen, für das Halten der Leiter und die damit verbundene Vermeidung von Unfällen.

Ein ganz großes Dankeschön an die Mitarbeiter der Firma *aura optik GmbH*, für die Geduld und die vielen Ideen bei der Entwicklung der Präparationsmethode. Besonders möchte ich mich bei Dr. Roland Kilper und Dr. Ute Müller für die gute Unterhaltung auch außerhalb der Firma bedanken.

Der IT-Abteilung, der Bibliothek und der Warenannahme, insbesondere Jens Ille für die Annahme meiner Bücher, des MPIs muss an dieser Stelle auch gedankt werden.

Dank gilt auch Susanne Donnerhacke und Dr. Astrid Groot von der Entomologie-Abteilung des MPIs sowie Andrea Lehr für die tatkräftige Unterstützung beim AFLP.

Ich möchte mich auch bei den ehemaligen und jetzigen Insassen des Büros D1.012 bedanken. Heiko Maischak und Margit Leitner für die vielen guten Ratschläge und Diskussionen zu meiner Arbeit aber auch zu anderen Themen. Franziska Buch, Andrea Lehr und Jyothi Vadassery danke ich für eine gute Atmosphäre und Unterhaltung im Büro.

Ich bedanke mich bei Monika Heyer und Mathias Rott, die mich als HIWI bzw. Praktikant bei der experimentellen Arbeit unterstützten.

Grit Winnefeld, Maritta Kunert, Rita Büchler, Anja David, Ilka Schönan, Anne Morgenstern, Kerstin Ploss, Franziska Buch und Janine Hofmann möchte ich für die unterhaltsamen Mittagspausen danken.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Boland für die Unterstützung und das nette Arbeitsklima bedanken.

Matthias Gieß danke ich für seine jahrelange Freundschaft, für das Aufnehmen des langen von Stau gezeichneten Weges von Karlsruhe nach Jena nur um mich aufzumuntern und natürlich für die „Korrektur“ meiner Kommas.

Ute Müller, Benjamin Busch, Carola Ruhe und Axel danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts der hier vorliegenden Arbeit.

Gerhard Pauls, Marcel Beckmann, Janine, Frenze, Ben, Caro und vielen anderen danke ich für die zahlreichen Kreativpausen im Irish Pub.

Anschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, bei meinen Eltern und meiner Schwester Lysann für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während der Promotion und Tante Uta, Onkel Rob und meiner Oma finanziellen Beistand, der mir nicht nur das Reisen ermöglichte.

## Erklärung

Jena, September 2011

Ich erkläre hiermit, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist.

Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben.

Sämtliche Personen, die mich bei der Auswahl, Auswertung und Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, sind in der Danksagung genannt.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Arbeit stehen.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ferner habe ich auch nicht versucht, die gleiche, eine in wesentlichen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation einzureichen.

-----  
Sandy Rottloff